

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento Microbiología III



**ANÁLISIS DE LAS PRINCIPALES RUTAS DE
IMPORTACIÓN Y EXPORTACIÓN NUCLEAR EN
“ASPERGILLUS NIDULANS”.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Lidia Araújo Bazán

Bajo la dirección del doctor
Eduardo A. Espeso Fernández

Madrid, 2008

- **ISBN: 978-84-692-2409-0**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA III

**Análisis de las principales rutas de importación y exportación nuclear
en *Aspergillus nidulans***

Memoria presentada por Lidia Araújo Bazán para optar al grado de Doctora

Director de Tesis:

Eduardo A. Espeso Fernández
Científico Titular del CSIC
Centro de Investigaciones Biológicas

Tutora:

Covadonga Vázquez Estévez
Departamento de Microbiología III
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid

TESIS DOCTORAL
LIDIA ARAÚJO BAZÁN
2008

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) del CSIC bajo la dirección del Dr. Eduardo A. Espeso Fernández, Científico Titular del CSIC.

El trabajo recogido en esta memoria ha sido financiado por fondos públicos de la Dirección General de Investigación a través de los proyectos BMC2003-00874 y BFU2006-04185, y una beca FPU del Ministerio de Educación y Ciencia a la doctoranda Lidia Araújo Bazán.

A mi familia.
A Alejandro.

AGRADECIMIENTOS

Parece mentira que ya hayan pasado cuatro años desde que llegué al laboratorio. Al principio ni siquiera tenía claro querer dedicarme a esto de la Ciencia y ahora estoy a punto de convertirme en Doctora.

Son muchas las personas que han pasado por el laboratorio en este tiempo y todas ellas, en mayor o menor medida, se merecerían una mención especial en estos agradecimientos porque todas han aportado algo a esta tesis y de todas me llevo un buen recuerdo. Sin embargo, siempre hay algunas que calan más hondo y por eso quisiera agradecer especialmente el apoyo recibo de América, Olga y Antonio con los que he compartido cada uno de los días de estos cuatro años, gracias por las risas, las confidencias y, de vez en cuando, los llantos. Quiero también agradecer a M. Ángel Peñalva que me permitiera incorporarme al grupo de trabajo allá por Septiembre de 2004 y a Elena Reoyo por estar siempre ahí cuando la he necesitado y por el gran papel que desempeña en el laboratorio, sin ti esto no sería lo mismo.

Pero sin duda la persona que se merece todos los agradecimientos posibles es Eduardo A. Espeso, Edu. Gracias por enseñarme a trabajar en el laboratorio, a pensar y razonar los experimentos, a interpretar los resultados y, lo más importante, a disfrutar, a llegar por las mañanas deseando empezar a trabajar con la ilusión de obtener buenos resultados. Gracias por preocuparte de mi formación, de que el trabajo se publicara para que pudiera tener un buen currículum al finalizar esta etapa, y por seguir preocupándote ahora que toca decidir qué hacer en el futuro. Gracias por ser un amigo con el que poder hablar no sólo de trabajo. Creo que hemos formado un buen equipo...quien sabe...lo mismo el destino nos vuelve a juntar.

Por último, quiero agradecer a mi familia el apoyo que siempre me ha dado. Por no poner el grito en el cielo cuando decidí estudiar Biología aún sabiendo lo difícil que es este mundo, y por no oponerse nunca a mis decisiones, tanto personales como profesionales. Especialmente, a mi hermana por ser la mejor persona que he conocido nunca, por los buenos ratos que hemos pasado viviendo juntas durante la época universitaria y porque también sabe lo que es escribir una tesis; ¡ya somos dos doctoras en la familia!

Y a Alejandro por aparecer en mi vida y llenarla de felicidad, por comprender y respetar mi trabajo y por no dejarme desesperar pensando en el futuro que se avecina. Con esta tesis se acaba una etapa...ahora empezamos nosotros una nueva.

ABREVIATURAS

CDS:	“CoDing Sequence”- secuencia codificante
cDNA:	DNA codificante
DAPI:	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa:	Desoxirribonucleasa
DO:	Densidad óptica
DTT:	1,4-ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilén diamino tetracético
Fig.:	Figura
FT:	Factor de transcripción
GDP:	Guanidín difosfato
GFP:	Proteína fluorescente verde.
GST:	Glutación-s-transferasa
GTP:	Guanidín trifosfato
HEPES:	Ácido N-(2-hidoxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
IgG:	Inmunoglobulina G
IPTG:	Isopropil β-D-tiogalactopiranósido
kb:	Kilobase
kDa:	Kilo Dalton
LMB:	Leptomicina B
MCA:	Medio completo de <i>Aspergillus</i>
MFA:	Medio de fermentación para <i>Aspergillus</i>
MMA:	Medio mínimo de <i>Aspergillus</i>
mRFP:	Proteína fluorescente roja monomérica
mRNA:	RNA mensajero
NES:	Señal de exportación nuclear
NLS:	Señal de localización nuclear
NPC:	Complejo del poro nuclear
pb:	Par de bases
PBS:	Tampón fosfato
PCR:	Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PEG:	Polietilenglicol.
PPR:	Repeticiones pentatricopeptídicas
p/v:	peso/volumen
RNA:	Ácido ribonucleico
r.p.m.:	Revoluciones por minuto
rRNA:	RNA ribosómico
SD:	Medio mínimo de levadura
SDS:	Sodio dodecil sulfato
SPB:	“Spindle Pole Body”
Tris:	Tris(hidroximetil)-aminometano
UV:	Ultravioleta

UTR:	Región no traducida (“ <i>untranslated region</i> ”)
v/v:	volumen/volumen
X-gal:	5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactopiranosido
WMM:	“Watch minimal medium”
YPDA:	Medio completo de levadura
ZZ:	Fusión de dos dominios Z de interacción con IgGs de la proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i>

Las abreviaturas que no se indican siguen el código de la IUPAC

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. <i>Aspergillus nidulans</i>	3
2. Transporte de moléculas entre el núcleo y el citoplasma	5
2.1 El gradiente de RanGTP	6
2.2 Señales necesarias para el transporte	7
2.3 Proteínas encargadas de llevar a cabo el transporte: Las carioferinas	8
2.3.1 Carioferinas con actividad importina-exportina	12
2.4 El complejo del poro nuclear	13
2.4.1 El poro nuclear durante la mitosis	15
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	21
1. Condiciones y medios de cultivo	23
1.1 Condiciones de cultivo y medios para <i>Aspergillus nidulans</i>	23
1.1.1 Medio mínimo de <i>Aspergillus</i>	23
1.1.2 Medio completo de <i>Aspergillus</i>	23
1.1.3 Medio de fermentación para <i>Aspergillus</i>	23
1.1.4 Soluciones y suplementos para medios de <i>Aspergillus nidulans</i>	24
1.2 Medios y suplementos para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
1.2.1 Medio mínimo de levadura	25
1.2.2 Medio completo de levadura	25
1.2.3 Solución 10xDropout –Tryptófano, -Leucina, -Histidina, -Adenina	25
1.2.4 Solución de requerimientos para complementar la solución Dropout	26
1.3 Medios para <i>Escherichia coli</i>	26
2. Cepas de microorganismos utilizadas	27
2.1 Cepas de <i>Aspergillus nidulans</i>	27
2.2 Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
2.3 Cepas de <i>Escherichia coli</i>	29
3. Vectores utilizados	29
3.1 Plásmidos utilizados en <i>Aspergillus nidulans</i>	29
3.2 Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y ensayos de doble híbrido	31
3.3 Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas <i>in vitro</i> y en <i>Escherichia coli</i>	36
4. Generación de casetes mediante PCRs de fusión	42
4.1 Construcciones utilizadas para la generación de alelos nulos	42
4.2 Construcciones utilizadas para la generación de cepas que expresan proteínas fusionadas a GFP o mRFP	44
4.3 Otras construcciones generadas mediante PCR de fusión	47
5. Técnicas de <i>Aspergillus nidulans</i>	47
5.1 Transformación de <i>A. nidulans</i>	47
5.2 Técnica de “pop-out”	48
5.3 Extracción de proteínas totales de <i>A. nidulans</i>	49
6. Técnicas utilizadas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50

7. Técnicas de biología molecular, bioquímica y proteómica	50
7.1 Ensayos de inmunodetección de proteínas, “Western Blot”	50
7.2 Síntesis y aislamiento de cDNA de <i>A. nidulans</i>	50
7.3 Expresión de proteínas recombinantes en <i>E. coli</i>	51
7.4 Cromatografía de afinidad	52
7.5 Identificación de proteínas de <i>A. nidulans</i> por espectrometría de masas	53
8. Microscopía de fluorescencia	54
8.1 Observación al microscopio de <i>A. nidulans</i>	54
8.2 Observación al microscopio de <i>S. cerevisiae</i>	55
9. “Kits” de biología molecular y bioquímica utilizados	56

PARTE I: Estudio de la ruta general de exportación nuclear en *Aspergillus nidulans*

Introducción	61
Resultados	65
1. Identificación del homólogo de la Exportina-1 en <i>Aspergillus nidulans</i>	65
2. <i>kapK</i> es un gen esencial	66
3. Generación de un alelo de <i>kapK</i> sensible a leptomicina B	69
3.1 Efecto del alelo <i>kapK1</i> , sensible a leptomicina B, en la ruta general de exportación nuclear en <i>Aspergillus nidulans</i>	71
4. Identificación de una carga natural de KapK: el activador específico de ruta NirA	72
5. Localización subcelular de la exportina KapK	77
6. Identificación de un componente del poro nuclear involucrado en exportación nuclear	80
6.1 NplA interacciona con la exportina KapK	82
6.2 Análisis del alelo nulo de <i>nplA</i>	85
6.3 Localización subcelular de NplA	86
6.4 Análisis funcional de NplA	90
6.5 NplA es una nucleoporina que se proteoliza	91
Discusión	93
1. El sistema general de exportación nuclear en <i>A. nidulans</i>	93
2. Localización de la Exportina-1 en <i>A. nidulans</i>	95
3. NirA es una carga natural de KapK	97
4. La nucleoporina NplA	99

PARTE II: Estudio de la ruta general de importación nuclear en *Aspergillus nidulans*

Introducción	105
Resultados	109
1. Caracterización del heterodímero Importina α /Importina β en <i>Aspergillus nidulans</i>	109
1.1 Identificación del homólogo de la Importina β en <i>A. nidulans</i>	110

1.1.1 Análisis del alelo nulo de <i>KapB</i>	111
1.2 Identificación del homólogo de la Importina α en <i>A. nidulans</i>	112
1.2.1 Generación y análisis del alelo nulo de <i>kapA</i>	114
2. Mutante condicional en la Importina α de <i>A. nidulans</i>	116
2.1 Generación del alelo termosensible <i>kapA31</i>	117
2.2 Efecto del alelo termosensible <i>kapA31</i> en la ruta de importación nuclear	118
3. Distribución en la célula de los elementos de la ruta clásica de importación nuclear: el heterodímero Importina α /Importina β 1	119
3.1 Localización subcelular de KapB	119
3.2 Localización subcelular de KapA	122
3.3 Papel del citoesqueleto en la localización subcelular de la Importina α y la Importina β	124
3.4 El motor dineína/dinactina está implicado en el transporte de la Importina α	127
4. Caracterización de cargas de la ruta de importación nuclear mediada por la Importina α	128
4.1 Identificación de proteínas capaces de interaccionar con la Importina α	128
4.2 La proteína NapB y su interacción con la Importina α	132
4.2.1. La proteínas con dominios “Nucleosome assembly proteins” en <i>A. nidulans</i> , NapA y NapB	132
4.2.2 NapB interacciona específicamente con KapA	135
4.2.3 La interacción entre NapB y KapA se produce a través de la NLS monopartita de NapB	139
4.2.4. NapB y la ciclina NimE compiten <i>in vitro</i> por la unión con la Importina α	140
4.2.5. NapB es nuclear en interfase y citoplásmica durante mitosis	143
4.2.6 Mecanismos implicados en la regulación de la localización nuclear de NapB	145
4.3. Velvet, VeA: la proteína que regula morfogénesis en respuesta a luz es transportada por la Importina α	149
4.3.1 VeA posee un putativa NLS bipartita en su región N-terminal	150
4.3.2 La localización subcelular de VeA es dependiente de la luz en <i>A. nidulans</i>	151
4.3.3 Análisis funcional de la NLS bipartita de VeA	152
4.3.4 KapA interacciona con VeA	154
4.3.5 Estudio de la localización subcelular de VeA en fondos genéticos mutantes para la Importina α	156
Discusión	158
1. El sistema general de importación nuclear en <i>A. nidulans</i>	158
2. Localización de la maquinaria de importación nuclear	161
3. Cargas reconocidas por la Importina α de <i>A. nidulans</i>	164
4. Los citoesqueletos de actina y tubulina parecen desempeñar un importante papel en los procesos de transporte	167
5. Nucleosome assembly proteins en <i>A. nidulans</i>	169
6. La respuesta a la luz en <i>A. nidulans</i>	171

APÉNDICE 1: Caracterización del mutante termosensible <i>pprA1</i>	175
Introducción	177
Resultados y Discusión	178
1. Aislamiento y caracterización del mutante <i>pprA1</i>	178
2. Caracterización del gen <i>pprA</i>	180
3. <i>pprA</i> es un gen esencial	181
4. Fenotipo de la mutación <i>pprA1</i>	183
4.1 Organización de la Tubulina α en la cepa <i>pprA1</i>	185
4.2 Efecto de la mutación <i>pprA1</i> sobre el citoesqueleto de actina	185
4.3 La mutación <i>pprA1</i> afecta a la integridad morfológica de las mitocondrias	187
Consideraciones generales	188
 APÉNDICE 2: Endocitosis y crecimiento polar en <i>Aspergillus nidulans</i>	191
Introducción	193
Resultados	194
1. Caracterización de <i>abpA</i> , el homólogo de <i>abp1</i> en <i>A. nidulans</i>	194
1.1 Generación y análisis del alelo nulo de <i>abpA</i>	198
2. Localización subcelular de AbpA	198
2.1 Los parches de AbpA colocalizan con los parches de actina	199
2.2 La localización subcelular de AbpA depende de F-actina pero no de la presencia de microtúbulos	200
2.3 Los parches de AbpA se distribuyen de forma aleatoria durante el crecimiento isotrópico y se polarizan una vez emitido el tubo germinativo	201
3. AmpA, el ortólogo de Rvs167p en <i>A. nidulans</i> , también presenta una distribución polarizada	202
4. SlaB, un componente de los parches de actina, se localiza en un anillo subapical localizado en la punta de la hifa	204
4.1 <i>slaB</i> es un gen esencial	207
Discusión	208
 CONCLUSIONES GENERALES	211
 Bibliografía	215
 Anexo	237

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. *ASPERGILLUS NIDULANS*.

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso perteneciente al filo *Ascomycota*, clase *Plectomycetes*^{1,2}. Sus células vegetativas crecen por extensión apical formando largos filamentos ramificados, denominados hifas, que se entrecruzan y fusionan (anastomosis) formando una red o micelio. Las hifas contienen numerosos núcleos, generalmente haploides, y están segmentadas mediante septos perforados que permiten el tránsito de nutrientes entre los distintos compartimentos, por lo tanto es un organismo cenocítico. Los núcleos de una hifa contienen todos la misma información genética (n ó $2n$), salvo en el caso de los heterocariontes ($n+n$).

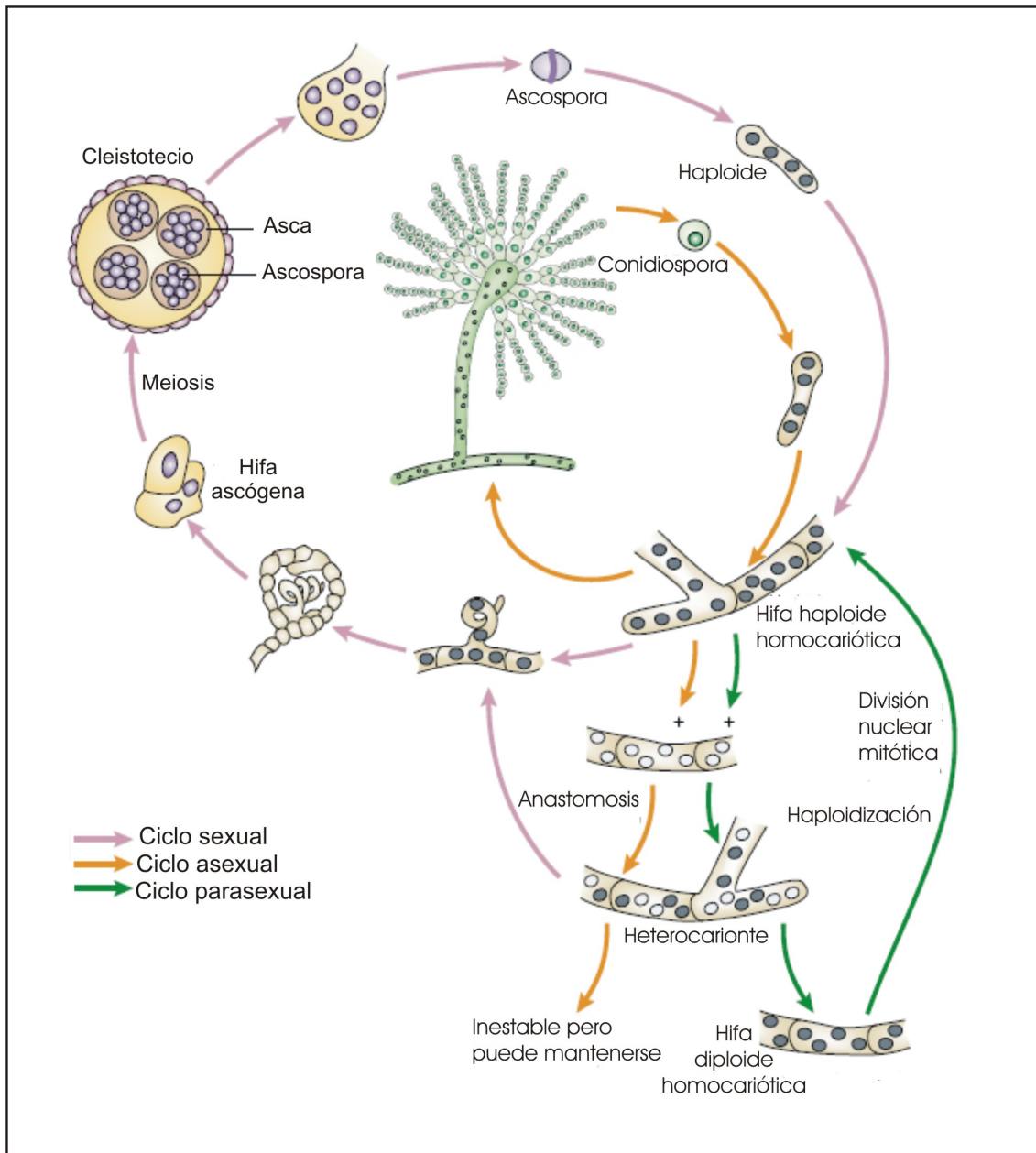
A. nidulans es un hongo homotálico cuyas hifas pueden entrar en contacto y fusionarse intercambiando así material citoplásmico y nuclear. En su ciclo de vida se pueden distinguir tres fases: vegetativa, sexual y parasexual^{1,3} (Fig. 1). El ciclo asexual comienza con la germinación de una espora (conidiospora). Las conidiosporas son esporas uninucleadas y pueden ser haploides (n) o diploides ($2n$) en dependencia del tipo de micelo. En su estado haploide (n) se puede manifestar el fenotipo de las mutaciones recesivas viables. Las conidiosporas se forman en hifas aéreas especializadas, en una estructura compleja denominada conidióforo cuya morfología es característica de los *Plectomycetes*. El ciclo sexual comienza cuando dos hifas homocarióticas se fusionan por anastomosis y forman una nueva célula heterocariótica donde los distintos núcleos se sitúan próximos entre sí. Mediante mitosis se produce la división sincronizada de ambos tipos de núcleos que, finalmente, se fusionan (cariogamia) formando un núcleo diploide transitorio. Esta célula ($2n$) o cigoto se divide por meiosis y los cuatro productos meióticos resultantes se dividen posteriormente por mitosis para dar lugar a ocho ascosporas haploides que no están ordenadas dentro del asca. Antes de que las ascosporas maduren totalmente, cada núcleo se divide mitóticamente por segunda vez sin que haya división celular. Debido a este proceso cada asca madura contiene ocho ascosporas binucleadas, de forma discoidal y con dos características crestas situadas alrededor del ecuador de la espora. Los cuerpos fructíferos formados durante la reproducción sexual son estructuras esféricas, denominadas cleistotecios, repletas de ascas. Cuando el cleistotecio se rompe, las ascosporas se liberan para germinar e iniciar un nuevo ciclo de vida vegetativo. Opcionalmente, *A. nidulans* puede atravesar un ciclo de vida parasexual donde, tras la anastomosis de dos hifas, dos núcleos se fusionan y se forma una estirpe diploide. La

dotación cromosómica n se restablece por haploidización, suceso poco frecuente que puede inducirse mediante el uso de agentes que interfieren con la migración de los cromosomas durante la anafase mitótica como la p-fluorofenilalanina o el benomilo. En este caso se produce intercambio cromosómico y pueden producirse también sucesos de recombinación mitótica entre los diferentes cromosomas de los núcleos parentales, dando lugar, tras diferentes estadios aneuploides inestables a un organismo con núcleos n genéticamente distintos a los de sus predecesores ¹.

A. nidulans es uno de los hongos filamentosos considerado como organismo modelo. Como organismo homotálico constituye el modelo genético de referencia para otros miembros asexuales y heterotálicos del género *Aspergillus* de gran interés en la industria, como *A. oryzae* o *A. flavus*; o en medicina, como *A. fumigatus*. A esta característica se une su enorme versatilidad metabólica, que ha permitido identificar numerosas rutas del metabolismo primario y secundario. La extraordinaria conservación entre *Aspergillus* y eucariotas superiores en los pasos enzimáticos e intermediarios metabólicos de determinadas rutas biosintéticas y degradativas ha permitido la identificación de los genes implicados en enfermedades metabólicas de origen genético en humanos ⁴. Además, el hecho de ser un hongo filamentoso, convierte a *A. nidulans* en un organismo donde se pueden estudiar aspectos del desarrollo celular difícilmente analizables en otros sistemas, como por ejemplo en el hongo uninuclear *Saccharomyces cerevisiae*. El crecimiento hiperpolarizado, el diseño celular sincitial con múltiples núcleos y la existencia de un citoesqueleto de microtúbulos, deben suponer una gran diferencia en cuanto a los genes que determinan estas características y que acercan mucho a *A. nidulans* a modelos y tipos celulares de metazoos.

El genoma de *A. nidulans* se publicó en diciembre de 2005. Contiene 30Mpbs organizadas en ocho cromosomas y un número mínimo estimado de poco más de 10.000 genes ⁵. Disponer de dicha información genera una nueva herramienta de trabajo y supone un avance importante que permitirá seguir utilizando *A. nidulans* como organismo modelo, genéticamente manipulable, donde realizar estudios de genética y biología celular y molecular en eucariotas.

Figura 1: Ciclo de vida de *Aspergillus nidulans*. Esquema de las diferentes fases que se pueden distinguir en el ciclo de vida de este hongo (ver texto para más detalle). Tomado de referencia ³.



2. TRANSPORTE DE MOLÉCULAS ENTRE EL NÚCLEO Y EL CITOPLASMA.

Las células eucariotas se caracterizan por la presencia del núcleo, el compartimento celular que contiene la totalidad del genoma de estos organismos. El nucleoplasma se encuentra físicamente separado del citoplasma por una doble membrana contigua al retículo endoplasmático, denominada envoltura nuclear. La separación física entre el núcleo y el citoplasma implica el desacoplamiento entre el fenómeno de la transcripción y la traducción y dota a la célula de un punto de control adicional mediante la regulación del transporte entre el nucleoplasma y el citoplasma.

Las proteínas traducidas en el citoplasma y cuya función debe desarrollarse en el núcleo han de ser transportadas a su interior. Este proceso se denomina importación nuclear. Por el contrario, otras moléculas cuya función se desarrolla en el citoplasma, como determinados ácidos ribonucleicos, mRNAs, rRNAs y tRNAs, han de ser transportados del núcleo al citoplasma, proceso al que se denomina exportación nuclear.

La entrada o salida de moléculas del núcleo tiene lugar a través de canales proteicos situados en la envoltura nuclear. Estos canales reciben el nombre de complejos del poro nuclear (NPC) y están formados por subunidades denominadas nucleoporinas, que a su vez están agrupadas en sub-complejos multiproteicos dispuestos dentro de la envoltura nuclear o asociados a su cara externa o interna respecto al nucleoplasma. El tamaño del canal permite la difusión libre de proteínas menores de 60kDa, aunque esta difusión es sólo eficiente para proteínas de menos de 30kDa ⁶. Las proteínas transportadas pasivamente se localizan según sus afinidades relativas por determinadas estructuras celulares o macrocomplejos. Así, por ejemplo, la proteína RanGEF/RCC1, que posee un tamaño de 45kDa, permanece en el interior del núcleo gracias a su capacidad de unirse a la cromatina a través de su interacción con las histonas H2A y H2B ⁷. Las proteínas con un tamaño superior a 60kDa necesitan ser transportadas de forma activa. Para dicho transporte se precisa energía en forma de GTP, la presencia de receptores de transporte denominados carioferinas y señales de transporte en la molécula que va a ser transportada.

2.1 El gradiente de RanGTP.

El transporte entre el núcleo y el citoplasma de la célula eucariota necesita energía y depende de la existencia de un gradiente de RanGTP entre ambos compartimentos. Ran es una GTPasa de la familia Ras de pequeño tamaño que alterna entre la forma unida a GDP (RanGDP) o a GTP (RanGTP). La distribución de estas dos formas de Ran en la célula es asimétrica. En el interior del núcleo existe una alta concentración de la forma RanGTP mientras que en el citoplasma su concentración es muy baja y predomina la forma RanGDP. Este gradiente está determinado por la distribución asimétrica de los componentes del sistema: los interactores RanGEF, RanGAP, RanBP1 y el transportador NTF2 ⁸. RanGEF es una proteína exclusivamente nuclear debido a su asociación con las histonas H2A y H2B ⁷, mientras que RanGAP y RanBP1 son exclusivamente citoplásmicas. RanGEF es el principal intercambiador de nucleótidos de Ran, genera RanGTP a partir de RanGDP ⁹. RanGAP es la única

proteína activadora de la actividad GTPasa de Ran y favorece la conversión de GTP en GDP ¹⁰. RanBP1 es una proteína que se une específicamente a RanGTP y es necesaria para que RanGAP pueda activar la actividad GTPasa de Ran ¹¹.

En la figura 2 se esquematiza el ciclo de Ran en el que participan los componentes mencionados anteriormente. La interacción de RanGTP con RanGAP/RanBP1 en el citoplasma estimula su actividad GTPasa dando lugar a la formación de RanGDP. Esta forma de Ran unida a GDP es transportada al núcleo mediante la proteína NTF2 y una vez allí RanGEF cataliza el intercambio de GDP por GTP formándose de nuevo RanGTP. RanGTP estimula la liberación de las cargas mediante su interacción con las importinas y se recicla hacia el citoplasma al unirse a las exportinas para mediar la exportación de cargas hacia el citoplasma ¹².

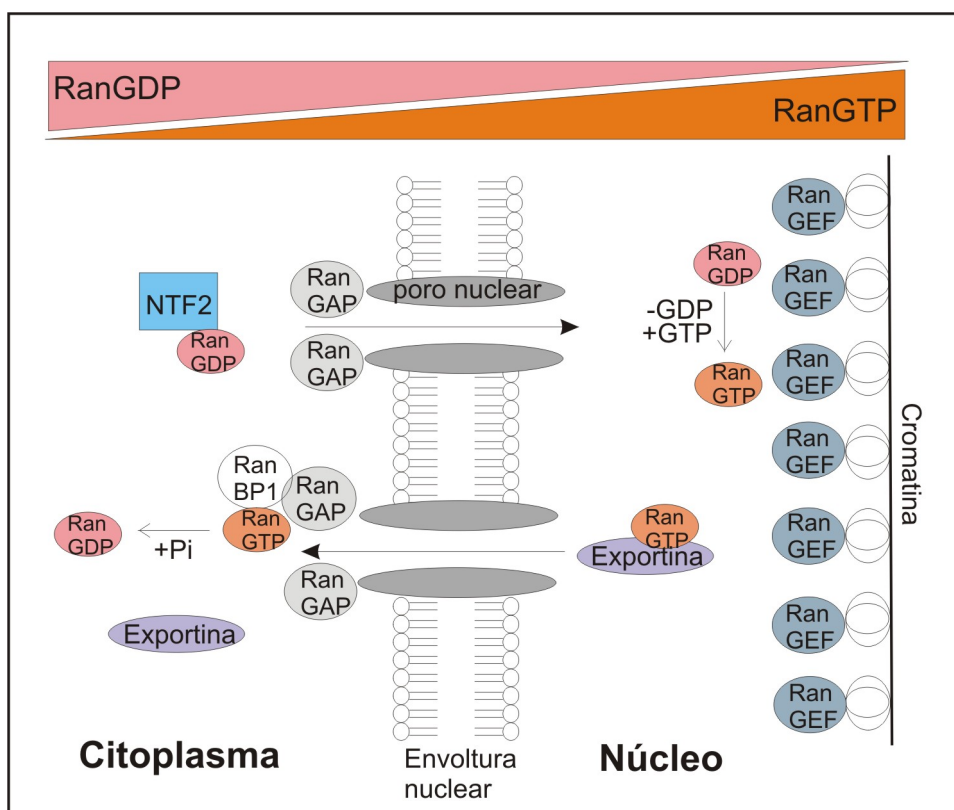


Figura 2: Ciclo de la GTPasa Ran. La distribución asimétrica de RanGAP y RanBP1, situadas en el citoplasma, y RanGEF, en el interior del núcleo asociada a la cromatina, genera un gradiente de RanGDP/RanGTP entre el nucleoplasma y el citoplasma, indicado en la parte superior de la figura. Este gradiente permite la asociación y disociación de las cargas a sus respectivos transportadores (ver más detalle en el texto).

2.2 Señales necesarias para el transporte.

Las proteínas que tienen que ser transportadas del citoplasma al núcleo o viceversa portan señales que las identifican como sustratos de ese transporte y que

permiten su reconocimiento por parte de las proteínas transportadoras o de un adaptador. Esta señal es generalmente una secuencia de aminoácidos corta que en el caso de los sistemas de importación nuclear se denominan señales de localización nuclear (NLS) y en los sistemas de exportación nuclear se denominan señal de exportación nuclear (NES).

Las NLSs mejor conocidas y más abundantes son las denominadas NLSs clásicas, formadas por un grupo de residuos básicos entre los que predominan las lisinas y las argininas ¹³. Existen dos tipos de NLSs clásicas: las monopartitas y las bipartitas. Las NLSs monopartitas están formadas por un único grupo de residuos básicos mientras que las NLSs bipartitas están formadas por dos grupos de residuos de lisinas y argininas. Este tipo de señales son reconocidas específicamente por la Importina α y las proteínas que las contienen son transportadas al núcleo por el heterodímero Importina α /Importina β 1 (para más detalle consultar Introducción Parte II). En el caso de las NES, las mejor estudiadas son las reconocidas por el exportador general CRM1/Exportina1. Este tipo de señales son secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos, principalmente leucinas ^{12,14} (para más detalle consultar Introducción Parte I).

2.3 Proteínas encargadas de llevar a cabo el transporte: carioferinas.

Las carioferinas son proteínas que median el transporte a través del NPC. Según la direccionalidad del transporte para el que fueron inicialmente descritas se las ha clasificado en importinas, o mediadoras de la importación nuclear, y exportinas, o mediadoras de la exportación nuclear. La mayoría de las carioferinas pertenecen a la superfamilia de las importinas β , las cuales probablemente evolucionaron a partir de un ancestro común ¹⁵. Se han identificado 14 miembros de esta superfamilia en *S. cerevisiae*, y 22 en mamíferos ^{16,17}. Las importinas tipo β son las encargadas de mediar el transporte de la mayor parte de las proteínas y de las diferentes especies de RNAs, excepto de la exportación de mRNAs, llevado a cabo por la proteína Tap/Mex67 ⁸. Estas proteínas comparten características estructurales y funcionales comunes; sus masas moleculares están en el rango de 90-150kDa y comparten un modelo estructural de repeticiones contiguas de dominios HEAT ^{18,19}.

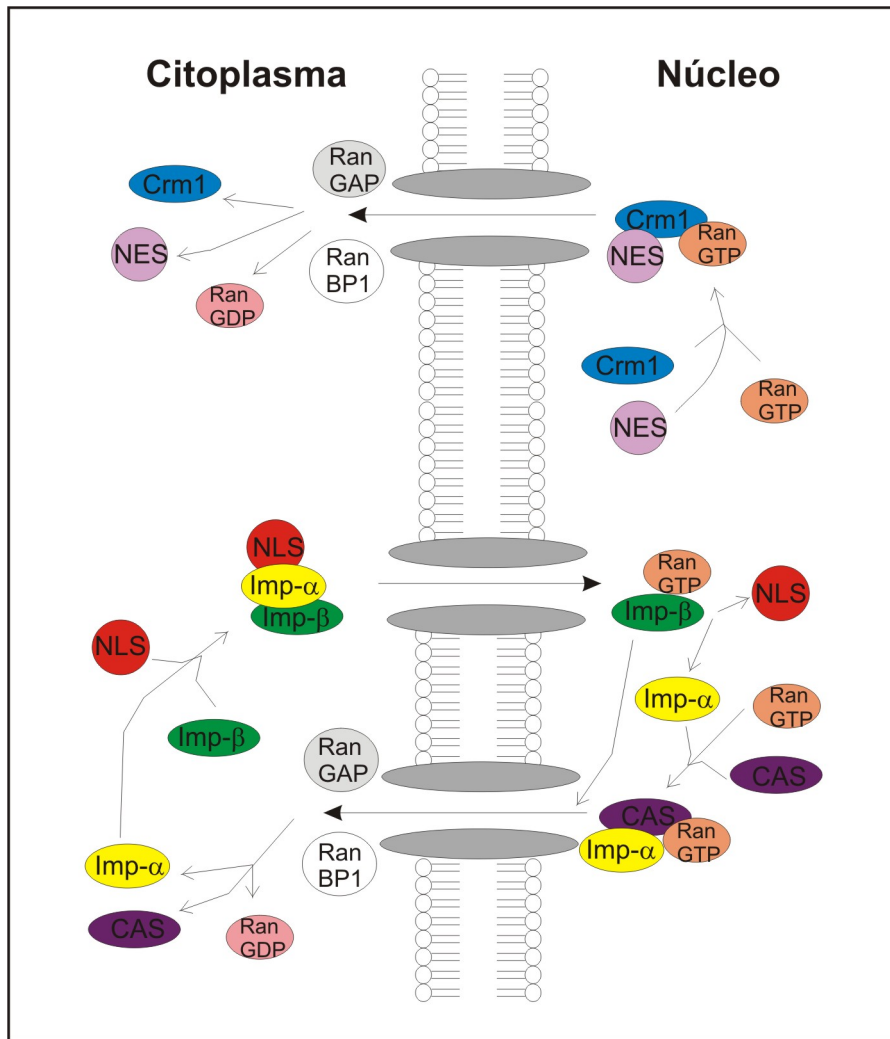


Figura 3: Esquema general del transporte nuclear mediado por carioferinas tipo β . En la parte superior se representa el ciclo de exportación llevado a cabo por el exportador general Crm1. En la parte inferior está representado el ciclo de importación nuclear llevado a cabo por el heterodímero Importina α /Importina β . Se muestra además la exportación de la Importina α por parte de su exportador, CAS. En el texto se detalla el proceso descrito en la figura.

La carioferina mejor caracterizada es la Importina β 1 tanto a nivel atómico¹⁹ como funcional al definir las distintas señales de localización nuclear que es capaz de reconocer, tanto directamente como a través de los adaptadores Importina α o Snurportina, lo que ha permitido generar un modelo de funcionamiento que ha sido extrapolado al resto de las carioferinas tipo β ¹⁸. En la figura 3 se representa un modelo del transporte mediado por las carioferinas tipo β . En la parte superior se describe el ciclo de exportación nuclear, en el que la exportina (Crm1), en condiciones de alta concentración de RanGTP como las que se dan en el nucleoplasma, reconoce una proteína que contiene una NES junto a una molécula de RanGTP. El complejo es entonces capaz de interactuar con el NPC y atravesarlo hasta el citoplasma. Una vez

allí, RanBP1 y RanGAP promueven la actividad GTPasa de Ran, que hidroliza el GTP y pasa a convertirse en RanGDP. La hidrólisis produce un cambio conformacional en Ran^{20,21} que da lugar al desensamblaje en cadena del heterocomplejo exportina-carga, quedando ésta última libre en el citoplasma. Las moléculas de RanGDP y exportina se reciclan para un nuevo ciclo de transporte gracias al transporte nuclear mediado por NTF2 e interacción con el NPC, respectivamente.

En el caso de la importación nuclear, esquematizado en la parte inferior de la figura 3, el heterodímero Importina α /Importina β 1 interacciona en el citoplasma, en condiciones de baja concentración de RanGTP, con la proteína poseedora de una NLS, y entra al interior del núcleo mediante asociación con proteínas del NPC. Una vez en el nucleoplasma, la presencia de altos niveles de RanGTP causa la destrucción del complejo importina-carga, liberándose la carga en el interior del núcleo. La Importina α es transportada de nuevo al citoplasma mediante su interacción con el heterodímero CAS-RanGTP reiniciándose de nuevo el proceso.

Como se ha mencionado anteriormente, los miembros de la superfamilia de proteínas tipo β comparten un modelo estructural basado en repeticiones HEAT, tanto las importinas como las exportinas. Este hecho hace pensar en la existencia de un antecesor común que pudiera llevar a cabo el transporte de proteínas en ambas direcciones, y pequeños cambios en la estructura habrían llevado a la aparición de proteínas especializadas en un único tipo de transporte. Actualmente, el mecanismo molecular propuesto para explicar los modelos de importación y exportación nuclear se basa en la presencia de un lazo de residuos ácidos situado entre dos repeticiones HEAT en una determinada región de la estructura (Fig. 4). En el caso de la ruta de exportación nuclear este lazo de residuos ácidos dificulta la unión del sustrato en el interior del núcleo e impide la unión de Ran. Cuando Ran o el sustrato se unen a la exportina se produce un cambio de conformación en el lazo, siendo entonces posible la formación del heterocomplejo Ran/CRM1/Carga. Una vez en el citoplasma, la hidrólisis de GTP provoca un nuevo cambio de conformación, el lazo de residuos ácidos desplaza a la carga y ésta queda libre en el citoplasma. En el caso de la importación nuclear la situación del lazo de residuos ácidos en el citoplasma no impide la unión de la carga. Una vez en el interior del núcleo la interacción del complejo Importina/Carga con RanGTP provoca un cambio de conformación y el alza de residuos ácidos desplaza al sustrato de su sitio de unión²².

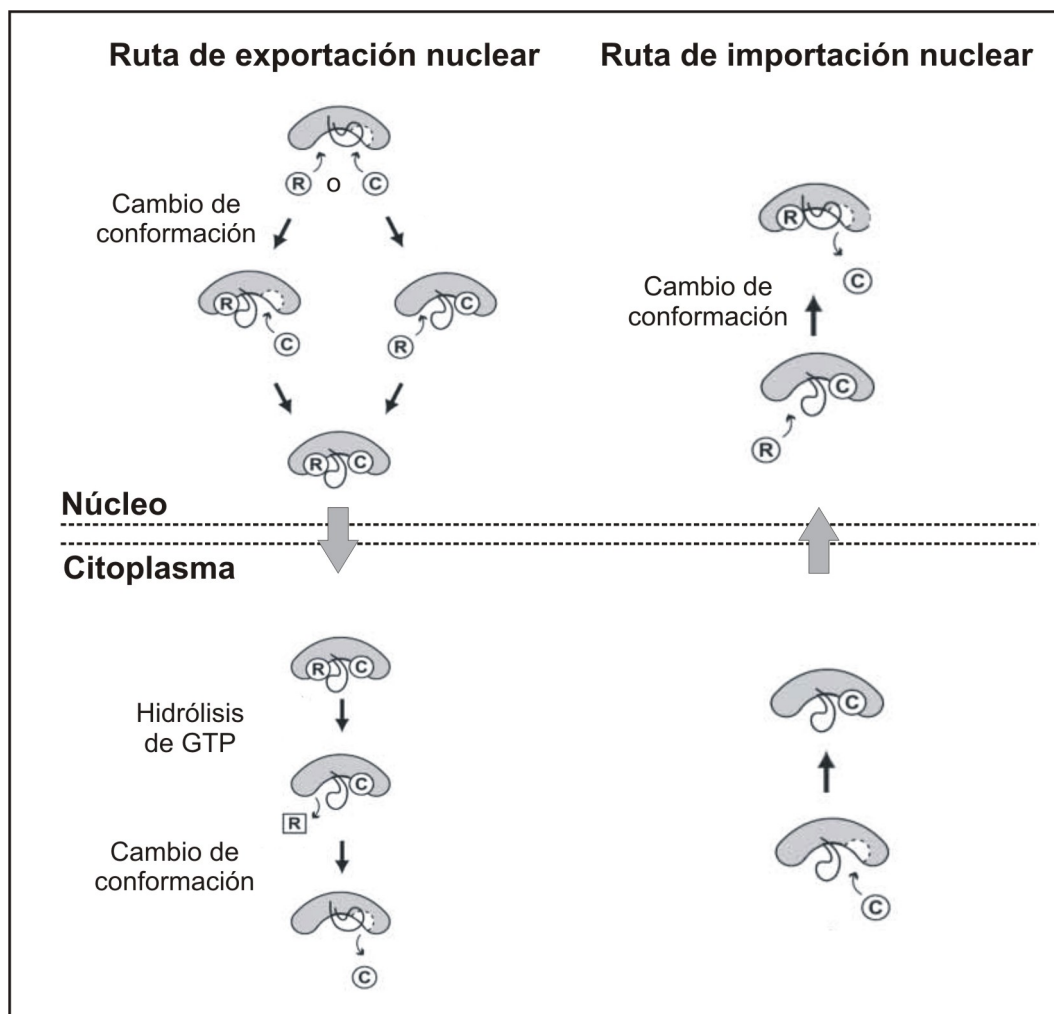


Figura 4: Diferencias entre las rutas de exportación e importación nuclear. A la izquierda está representada la ruta general de exportación nuclear. La presencia del lazo de residuos ácidos dificulta la unión de RanGTP (R) y la carga (C) a CRM1. La unión de uno de los dos elementos, Ran o la carga, provoca un cambio de conformación en el lazo que permite la formación del complejo Ran/CRM1/Carga. La hidrólisis de GTP provoca un nuevo cambio de conformación en el lazo de residuos ácidos que conduce a la liberación de la carga en el citoplasma. En el caso de la importación nuclear (derecha) la carga puede unirse a la importina en el citoplasma y es la unión de Ran en el núcleo lo que provoca un cambio de conformación en el lazo de residuos ácidos que lleva a la liberación de la carga.

A parte de la exportación nuclear llevada a cabo por el exportador general CRM1/Exportina-1 y la importación nuclear mediada por el heterodímero Importina α /Importina β 1, que se describen con más detalle en las partes I y II de esta tesis, otra de las vías de exportación nuclear mejor caracterizadas es el transporte de t-RNAs mediado por la Exportina-t/Los1p. La Exportina-t/Los1p es una carioferina de la superfamilia de las importinas β capaz de unirse directamente a los tRNAs y de manera cooperativa a RanGTP para formar un heterocomplejo de exportación²³. A través de las interacciones de la Exportina-t con los componentes del poro nuclear, en concreto con:

Nup153p (en el lado nuclear del NPC), Nup358p y CAN/Nup214p (en el lado citoplasmático); el heterocomplejo llega hasta el citoplasma donde, con la conversión de RanGTP a RanGDP, se liberan los tRNAs ²⁴. La Exportina-t/Los1p posee mayor afinidad por los tRNAs maduros que por los precursores o por los tRNAs con mutaciones que dan lugar a extremos defectuosos o estructuras tridimensionales alteradas ^{25,26}. Esta afinidad selectiva ha sido propuesta como un mecanismo de control de calidad que evitaría la liberación en el citoplasma de tRNAs inmaduros o defectuosos. Sin embargo, el transporte por la Exportina-t/Los1p no es la única vía de exportación de tRNAs en la célula, sino que la Exportina 5 es también capaz de mediar la exportación de este tipo de moléculas ²⁷. Congruentemente con esta doble ruta de exportación nuclear de tRNAs, el gen que codifica para Los1p en *S. cerevisiae* no es esencial, aunque la cepa con el alelo nulo muestra un fenotipo ligeramente afectado en crecimiento y en el exporte de tRNAs.

Las carioferinas, además de su función como transportadores, están implicadas en otros procesos celulares como son: el ensamblaje del complejo del poro y de la envoltura nuclear en las mitosis abiertas, y la regulación y dinámica de la formación del huso acromático durante la mitosis en metazoos ^{16,28}.

2.3.1 Carioferinas con actividad importina-exportina.

La clasificación de las carioferinas como importinas o exportinas se basa en la direccionalidad del transporte para el que fueron descritas originalmente cada una de ellas. Pero esta denominación se basaba en la suposición *a priori* de que las carioferinas sólo podían mediar el transporte de cargas en una dirección. Sin embargo este paradigma ha resultado ser erróneo, ya que se han descrito varios casos en los que una misma carioferina es capaz de mediar tanto la importación como la exportación de distintas cargas.

La carioferina Msn5p/Kap142 fue inicialmente descrita como exportina de los factores de transcripción Pho4p ²⁹ y Mig1p ³⁰. Pho4p media la respuesta dependiente de fosfato inorgánico en el medio en *S. cerevisiae* ³¹. En condiciones de alta concentración de fosfato Pho4p es fosforilado por el complejo quinasa Pho85-Pho80. En este estado fosforilado Pho4p es entonces conducido fuera del núcleo por Msn5p/Kap142. El represor transcripcional Mig1p es exportado por Msn5p/Kap142 cuando es fosforilado por la quinasa Snf1p en respuesta a bajas concentraciones de glucosa ³⁰. Adicionalmente, Yoshida y Blobel ³² describieron una nueva función como importador

para Msn5p/Kap142 al transportar al núcleo el complejo de la proteína trimérica de replicación A (RPA), implicado en procesos de replicación, reparación y recombinación de DNA.

La Importina 13 fue caracterizada por Mingot et al.³³. En su trabajo se describe la búsqueda de proteínas capaces de interaccionar únicamente en ausencia de RanGTP o en presencia de elevadas concentraciones de la forma RanGTP. En el primer caso se encuentran la proteína implicada en SUMOilación de sustratos hUBC9 y el complejo de unión a RNA RBM8-MGN, que son transportadas activamente al interior del núcleo por la Importina 13. En el segundo caso se encuentra el factor de iniciación eIF1A, el cual es exportado activamente al citoplasma por la misma carioferina. El mecanismo que permite liberar a eIF1A en el citoplasma es complejo. En primer lugar es parcialmente dependiente de la conversión de RanGTP en RanGDP y, en segundo lugar, depende en mayor medida de la competición por la unión a la carioferina de las cargas destinadas a ser importadas en un nuevo ciclo de transporte para esta exportina.

2.4 El complejo del poro nuclear.

La comunicación entre el interior del núcleo y el citoplasma se realiza a través de canales formados por grandes complejos multiproteicos que atraviesan la doble membrana nuclear. Estas estructuras reciben el nombre de complejo del poro nuclear (NPC) y su tamaño es considerable, siendo de entre 60 y 125 MDa en vertebrados³⁴ y entre 44 y 66 MDa en *Saccharomyces cerevisiae*³⁵. El poro nuclear es permeable a las moléculas pequeñas (como el agua, iones, etc.) y a proteínas de tamaño menor de 30 kDa, pero es restrictivo para las macromoléculas que superan ese tamaño, siendo necesario entonces un transporte activo. Las proteínas que forman la estructura del NPC reciben el nombre genérico de nucleoporinas, participando alrededor de 30 nucleoporinas distintas en la formación de un solo NPC. La diferencia de tamaño entre el poro nuclear de *S. cerevisiae* y el de vertebrados se debe al número de copias de cada nucleoporina y no a una mayor diversidad de éstas³⁴⁻³⁶. La estructura del NPC en vertebrados y la levadura es muy similar (Fig. 5), y consta de varias partes³⁷: i) unos anillos concéntricos formados por nucleoporinas estructurales de tipo Pom que anclan el poro a la membrana, ii) 8 módulos radiales simétricos, formados por subcomplejos de nucleoporinas, que emiten prolongaciones hacia la parte citoplasmática (filamentos citoplasmáticos) y hacia la parte nuclear, donde coinciden en una estructura circular, formando lo que se conoce como canasta nuclear, iii) filamentos flexibles que tapizan el

interior del canal y se extienden hacia ambas aperturas del poro. Estos filamentos flexibles están formados por más de 200 copias de un tipo particular de nucleoporinas, las llamadas nucleoporinas FG, dado que contienen múltiples copias del motivo fenilalanina-glicina separadas por aminoácidos hidrofóbicos ³⁸. Las nucleoporinas FG se distribuyen de manera simétrica por las caras interiores y exteriores del canal, y algunas de ellas sólo se sitúan en uno de los lados del NPC. Mientras que las nucleoporinas de anclaje a la membrana y las integrantes de los módulos presentan estructuras tridimensionales muy sólidas y definidas, las regiones con repeticiones FG de las nucleoporinas FG están desestructuradas y tienen forma filamentosa ^{39,40}.

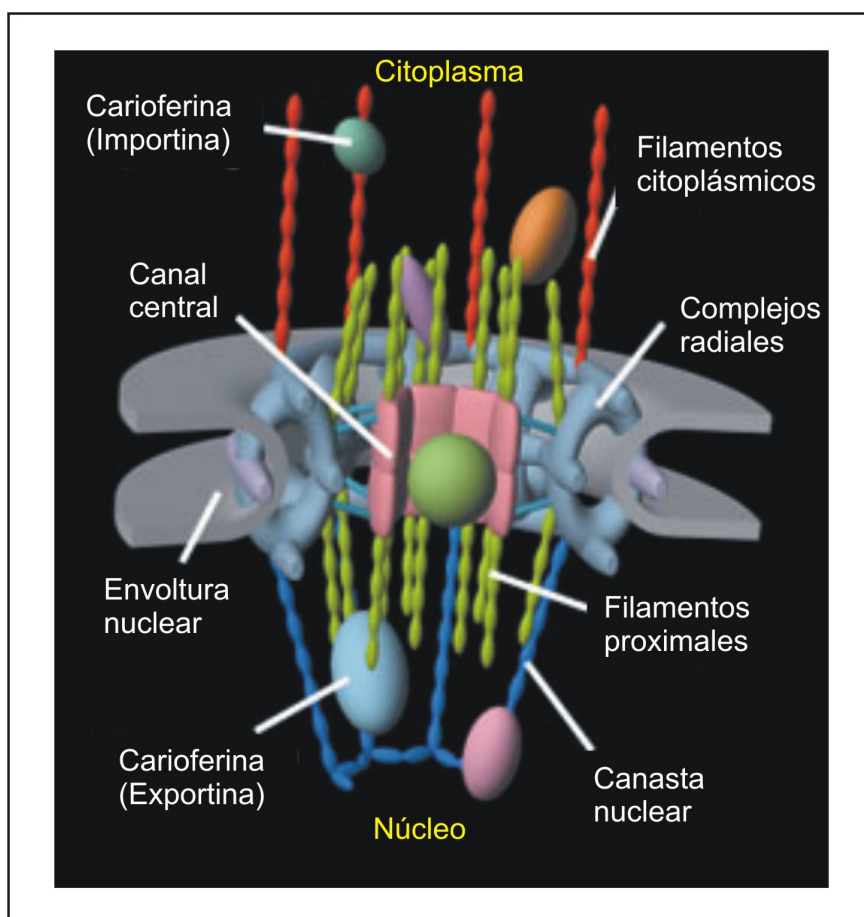


Figura 5: Modelo estructural del poro nuclear. Modelo de un poro nuclear eucariota en el que se indican las diferentes partes que lo forman. Tomado de <http://www.rockefeller.edu/labheads/rout/index.php>.

Diversos estudios han permitido establecer que estas regiones desestructuradas con repeticiones FG forman las verdaderas superficies de interacción de los transportadores con el NPC ⁴¹⁻⁴⁴. Las carioferinas unidas a sus cargas interactúan con las nucleoporinas FG a lo largo de todo el canal del poro y, sin necesidad de hidrólisis

de ATP o GTP, son capaces de atravesarlo completamente. Existen básicamente tres modelos propuestos que tratan de explicar este fenómeno a nivel molecular. El primero explica el movimiento de los transportadores debido a la afinidad creciente de las carioferinas por las distintas nucleoporinas FG situadas a lo largo del eje del canal ⁴⁵. El modelo “virtual gating” propone que el movimiento browniano de los filamentos de nucleoporinas FG que tapizan el poro forman una barrera entrópica para todas aquellas proteínas que no son transportadores, mientras que éstos, gracias a su capacidad para interaccionar débilmente con las repeticiones FG, ven facilitada su difusión a través del poro ³⁵. El último de los modelos propone que el NPC funciona por exclusión hidrofóbica de proteínas solubles. Las nucleoporinas FG formarían un ambiente hidrófobo que sólo podría ser atravesado por las carioferinas, dado que poseen superficies hidrófobas mediante las que interaccionan con las repeticiones FG ⁴⁶.

2.4.1 El poro nuclear durante la mitosis.

Durante la mitosis se han de producir cambios en la localización de numerosas proteínas. Este es el caso de la tubulina ⁴⁷ y varios reguladores del ciclo celular, como las ciclinas ⁴⁸. En las plantas ⁴⁹, metazoos ⁵⁰ y hongos basidiomicetos ⁵¹, este cambio de composición del contenido núcleo-citoplasmático durante la mitosis se produce, principalmente, por la desaparición de la envoltura nuclear. Al inicio de la profase se produce la separación gradual de algunas nucleoporinas del NPC, seguido del completo desensamblaje del NPC y la desaparición de la envoltura nuclear, que vuelve a reorganizarse durante la telofase ⁵². A este tipo de mitosis en las que se elimina la separación física entre el ambiente nuclear y citoplasmático se las conoce como mitosis abiertas.

En los hongos ascomicetos, como *A. nidulans* y *S. cerevisiae*, la envoltura nuclear permanece íntegra. Por esta razón, la mitosis en estos organismos recibe la denominación de mitosis cerrada. Sin embargo se ha comprobado que cambios en la composición del NPC de estos organismos durante la mitosis hacen variar su permeabilidad y constituyen un importante factor para la regulación de la localización de factores mitóticos. Concretamente, en el caso de la levadura *S. cerevisiae*, la entrada en mitosis coincide con la pérdida de la interacción interfásica entre las nucleoporinas Nup53p y Nup170p, lo que da lugar a la inhibición de las rutas de transporte dependientes de la importina Kap121p ⁵³, hecho que ha sugerido que durante la mitosis el NPC de la levadura se reorganiza en algunos de sus componentes que afectan a rutas

de transporte concretas, mientras que sus características y propiedades básicas permanecen inalteradas.

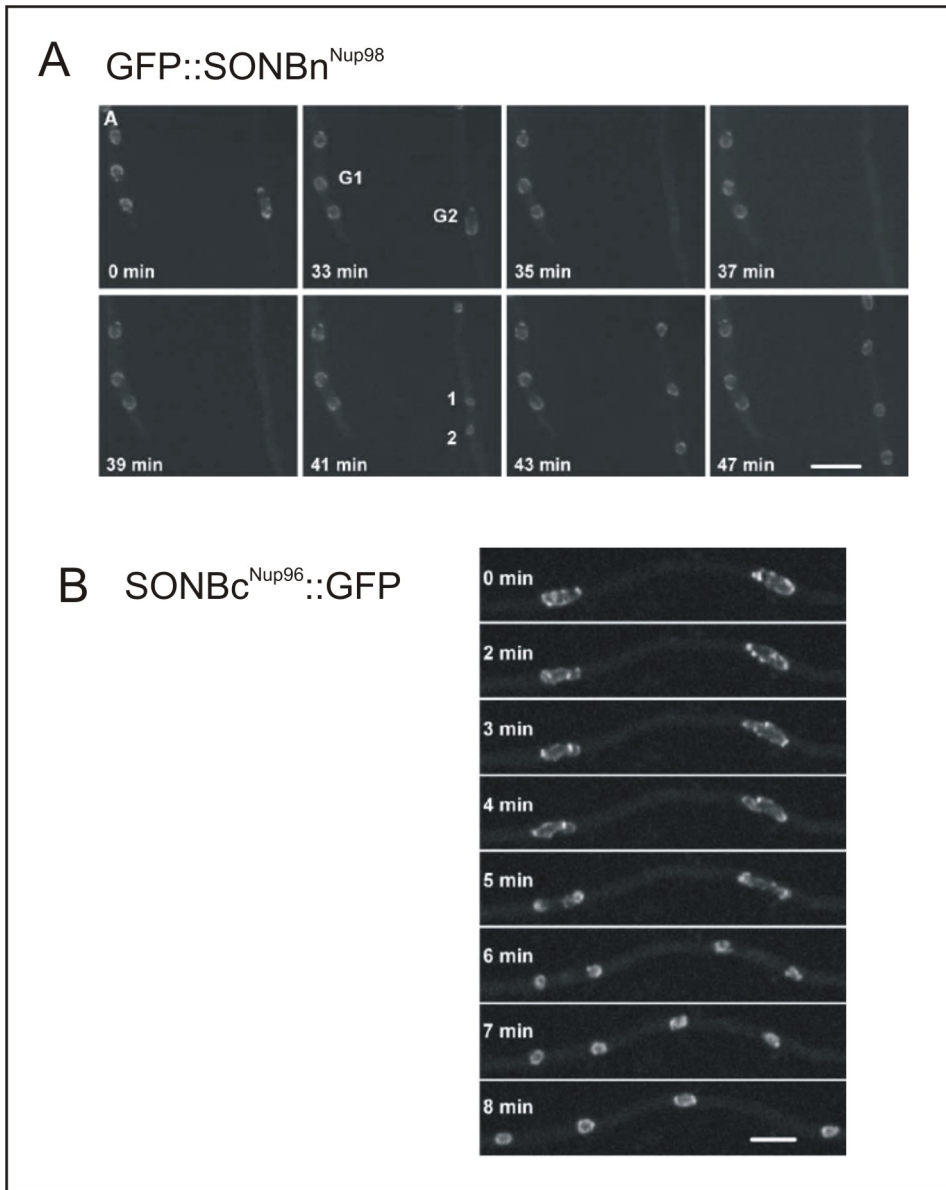


Figura 6: Desensamblaje parcial del poro nuclear durante mitosis en *A. nidulans*. Imágenes de microscopía confocal *in vivo* durante el proceso de mitosis en **A)** una cepa con la nucleoporina con repeticiones FG SONBn^{Nup98} fusionada a GFP; y **B)** una cepa con la nucleoporina estructural SONBc^{Nup96} fusionada a GFP. En la parte superior de cada imagen se muestra el tiempo en minutos. En el panel A, la fase del ciclo celular se indica con G1 y G2 y los dos nuevos núcleos que aparecen tras la mitosis como 1 y 2. Tomado de la referencia ⁵⁴.

A diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, en el hongo filamentoso *A. nidulans* la modificación del NPC es mucho más radical. En el trabajo publicado por De Souza *et al.* ⁵⁴ se demuestra que la entrada en mitosis coincide con el desensamblaje de diversas nucleoporinas con repeticiones FG, con lo que el NPC pierde sus propiedades

selectivas y queda reducido a sus componentes estructurales. Las nucleoporinas con repeticiones FG: SONBn^{Nup98}, Gle2p/SONA, AnNsp1, AnNup159 y AnNup42 se disocian del NPC dispersándose en el citoplasma al inicio de la mitosis y recuperando su localización perinuclear al finalizar el proceso de división (Fig. 6A). Por el contrario, las nucleoporinas estructurales SONBc^{Nup96}, AnNup133 y AnPom152, mantienen su localización en la periferia nuclear sin aparente variación durante todo el ciclo mitótico (Fig. 6B). De Souza *et al.*, también comprobaron que la proteína citoplasmática AnRanGAP, encargada de mantener el gradiente núcleo-citoplasmático de RanGTP, es capaz de acceder al interior del núcleo de *A. nidulans* durante la mitosis. La presencia de RanGAP en el núcleo sería, en principio, incompatible con el mantenimiento de un gradiente núcleo-citoplásmico de RanGTP y con el desarrollo de ciclos de transporte activo durante este periodo del ciclo celular del hongo. El conjunto de los resultados obtenidos por este grupo les permitió concluir que en *A. nidulans* se da una situación intermedia entre la mitosis abierta de vertebrados y la cerrada de *S. cerevisiae*. Al iniciarse la mitosis en el hongo la quinasa NIMA cambia su localización citoplasmática y se sitúa en la periferia nuclear, donde fosforila a SONBn^{Nup98}. La fosforilación de esta nucleoporina promueve su desensamblaje del NPC, así como el de, al menos, otras cuatro nucleoporinas con repeticiones FG. Como consecuencia, el NPC durante la mitosis, que mantiene sus componentes estructurales, permite la libre difusión de macromoléculas, entre las que se encuentra RanGAP. La combinación de la pérdida de puntos de interacción para las carioferinas en el poro y la desaparición del gradiente de RanGTP resulta en la desactivación de los procesos de transporte activo presentes en interfase. En estas condiciones, los factores mitóticos y otras proteínas son capaces de difundir libremente entre citoplasma y núcleo, lo que explica, por ejemplo, el fenómeno de entrada al núcleo de subunidades de tubulina durante mitosis ⁴⁷.

El desensamblaje parcial del complejo del poro nuclear durante la mitosis en *A. nidulans* se asemeja mucho a las primeras fases de la mitosis de metazoos, en las que la desaparición completa de la envoltura nuclear viene precedida por el desensamblaje de algunas nucleoporinas del NPC ⁵⁵. En este sentido, el mecanismo de regulación del transporte nuclear en mitosis del hongo supondría una situación evolutiva intermedia entre la mitosis totalmente abierta de vertebrados y la mitosis completamente cerrada de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS DE LA TESIS

Con esta tesis doctoral se inició el desarrollo de una nueva línea de investigación dedicada a analizar los sistemas de transporte entre el núcleo y el citoplasma en *A. nidulans*. Este tema no había sido abordado por ningún otro grupo de investigación por lo que no existían datos previos sobre los sistemas de transporte en este hongo ni en ningún otro hongo filamentoso. Debido a ello, los objetivos que se plantearon fueron:

- i) Estudiar los sistemas de transporte núcleo-citoplásmico en un organismo multinucleado.
- ii) Identificar y caracterizar el exportador general del sistema, el homólogo de CRM1/Exportina-1 en *A. nidulans*.
- iii) Identificar y caracterizar el principal importador del sistema de transporte, los homólogos del heterodímero Importina α /Importina β 1.
- iv) Generar formas mutantes en cada uno de los sistemas de transporte.
- v) Identificar cargas (proteínas) que sean exportadas del núcleo al citoplasma por la ruta de exportación general mediada por el homólogo de CRM1/Exportina-1.
- vi) Identificar cargas importadas al interior del núcleo por los homólogos del heterodímero Importina α /Importina β 1.
- vii) Caracterizar las señales que determinan la localización subcelular de las cargas identificadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CONDICIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

1.1 Condiciones de cultivo y medios para *Aspergillus nidulans*.

Todos los cultivos, tanto en medio sólido como líquido se realizaron a 37°C salvo cuando se indique lo contrario, y con una agitación orbital de 250 r.p.m. en el caso de cultivos en medio líquido. La composición de la solución de sales, los elementos traza (sin sales de fosfato) y los suplementos empleados en los medios se detalla en la sección 1.1.4, siguiendo la receta descrita en la referencia ⁵⁶.

1.1.1 Medio mínimo de *Aspergillus* (MMA).

Para 1 litro de medio mínimo de *Aspergillus* (MMA) se diluyeron 20ml de solución de sales con agua Milli-Q y se ajustó el pH a 6,5 con NaOH. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Para el medio mínimo sólido se añadió agar Oxoid al 1% (p/v) antes de la esterilización. Justo antes de ser utilizado (tanto al medio sólido como líquido) se añadieron los suplementos necesarios para el crecimiento de cada estirpe, así como la fuente principal de carbono y la de nitrógeno, generalmente D-glucosa 1% (p/v) y tartrato de amonio 5mM, respectivamente. En experimentos en los que se precisó la inducción de la expresión del promotor del gen *alcA* (*alcAp*) se creció la cepa correspondiente en MMA con 0,02% (p/v) de glucosa como fuente de carbono durante 18 h, siendo transferido el micelio filtrado a MMA fresco conteniendo 1% (v/v) Etanol ó 100mM L-Treonina como fuentes de carbono inductoras del promotor y se incubó a la temperatura seleccionada durante 2-3h adicionales.

1.1.2 Medio completo de *Aspergillus* (MCA).

Composición por litro: 20ml de solución de sales, 10ml de solución de casaminoácidos, 10g de D-glucosa, 2g de bactopectona y 1g de extracto de levadura. Se añadió agua hasta un litro y se ajustó el pH a 6,5 con NaOH. Para el medio sólido se añadió agar al 1% (p/v). El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Antes de ser utilizado, se le añadió 10ml de solución de vitaminas/litro, la fuente principal de nitrógeno y, en caso de necesitarse, los requerimientos adicionales específicos de cada estirpe.

1.1.3 Medio de fermentación (MFA)

Este medio incluye como principal componente 25g/l de CSL (Corn Steep Liquor) (lotes Cerestar-2062 o Laisa-60015). Se mezclaron bien las fases acuosa y sólida del CSL antes de pesarlo y, una vez pesado, se añadió el agua destilada y la solución de sales (20ml/l). Se agitó durante 20 minutos y se filtró al vacío utilizando un papel de filtro. El pH se ajustó a un valor de 6,8 con NaOH y el medio se esterilizó en autoclave a 110°C durante 20 minutos. Antes de ser utilizado se añadió, además de los suplementos específicos de cada estirpe, sacarosa al 3% (p/v) y tartrato de amonio 5mM como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente. Para cultivos continuos de 20 horas el pH del medio se tamponó a pH neutro mezclando NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 a la concentración final de 50mM para cada sal de fosfato. Adicionalmente se añadió NaCl a la concentración final de 50mM.

1.1.4 Soluciones y suplementos para medios de *A. nidulans*.

Solución de elementos traza sin sales de fosfato (sin P).

Para 1 litro:

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$40mg

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$400mg

FeCl_3800mg

ZnCl_28g

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$800mg

Solución de sales (Cove, 1966)⁵⁶

Para 1 litro (concentración 20X):

Cloruro de potasio..... 26g

Sulfato de magnesio $7\text{H}_2\text{O}$ 26g

Fosfato dihidrógeno de potasio..... 76g

Solución de elementos traza sin P..... 50ml

Solución de casaminoácidos.

Hidrolizado de caseína 150g/l. Esterilizar en autoclave 110°C, 20 minutos. Se utilizó como solución 10X.

Solución de vitaminas^{*}.

Para 1 litro:

Tiamina.....	50mg
Biotina.....	10mg
Ácido nicotínico.....	100mg
Pantotenato de calcio.....	200mg
Piridoxina-HCl.....	50mg
Riboflavina.....	100mg
Ác. p-aminobenzoico (PABA).....	100mg
Inositol.....	24g

* Esta solución se esterilizó mediante filtración y se guardó a 4°C protegida de la luz.

Suplementos:

Se prepararon en agua a una concentración de 100X, excepto para la biotina que fue de 10.000X.

Biotina: 100mg/l. Esterilizada por filtración.

Ácido p-aminobenzoico (PABA): 100mg/l. Autoclave, 20 minutos a 110°C.

Pantotenato de calcio: 200mg/l. Esterilizado por filtración.

Piridoxina-HCl (Vitamina B6): 5g/l. Esterilizada por filtración.

Inositol: 1,2g/l. Esterilizado por filtración.

1.2 Medios y suplementos para *Saccharomyces cerevisiae*.

1.2.1 Medio Mínimo de levadura (SD).

Para 400 ml de medio líquido se utilizaron 2,68g de YNB (Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids, Difco) en 320ml de agua destilada. Para medio sólido se añadió agar al 2% (p/v). Una vez autoclavado el YNB a 110 °C durante 20 minutos, se le añadió D-glucosa a una concentración final del 2% (40 ml de D-glucosa al 20% (p/v)) y 40 ml de 10X Dropout -trp, -leu, -his, -ade (ver sección 1.2.3). Este medio se suplementó con los aminoácidos específicos necesarios para cada cepa y condición.

1.2.2 Medio Completo de levadura (YPDA).

Composición por litro: 20g de peptona, 20g de D-glucosa, 10g de extracto de levadura y 200mg de adenina. El pH se ajustó a 5,8 con HCl y se autoclavó 20 minutos a 110 °C. Para el medio sólido se añadió agar al 2% (p/v).

1.2.3 Solución 10X Dropout –Triptofano, -Leucina, -Histidina, -Adenina.

L-arginina HCl	20 mg / 100ml	Merck	1543
L-isoleucina	30 mg / 100ml	Sigma	I-2752
L-lisina HCl	30 mg / 100ml	Sigma	L-5626
L-metionina	20 mg / 100ml	Sigma	M-9625
L-fenilalanina	50 mg / 100ml	Merck	7256
L-treonina	200 mg / 100ml	Fluka	89180
L-tirosina	30 mg / 100ml	Merck	83710025237
L-uracilo	200 mg / 100ml	Sigma	U-0750
L-valina	150 mg / 100ml	Sigma	V-0513

Los aminoácidos se disolvieron en agua. La solución se esterilizó por filtración y fue almacenada a 4 °C hasta su utilización.

1.2.4 Soluciones de requerimientos para complementar la solución Dropout.

Se prepararon a una concentración 100X y se esterilizaron por filtración. Para la selección de transformantes de levaduras se añaden los requerimientos específicos al medio SD según los marcadores de la transformación.

L-adenina hemisulfato	200 mg / 100 ml	Sigma	A9126
L-histidina HCl monohidrato	200 mg / 100 ml	Sigma	H8125
L-leucina	1000 mg / 100ml	Sigma	L8000
L-triptófano	200 mg / 100ml	Merck	8396

1.3 Medios para *Escherichia coli*.

Se utilizó LB ⁵⁷ como medio general para el crecimiento y mantenimiento de cepas transformadas. Este medio contiene: Bactotripton 10g/l, extracto de levadura 5g/l y NaCl 5g/l. El pH se ajustó a 7,5 con NaOH y se añadió agar al 1,5% (p/v) para el medio sólido. El medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a 110°C.

Para la selección de transformantes resistentes a ampicilina se añadió este antibiótico a una concentración final de 100µg/ml tanto en medio sólido como líquido. Cuando la selección fue para transformantes resistentes a kanamicina la concentración

final del antibiótico fue de 50µg/ml. Además, en caso de realizarse la selección de recombinantes por ausencia de actividad de la proteína reportera β-galactosidasa se añadió al medio X-gal a una concentración final de 83mM.

2. CEPAS DE MICROORGANISMOS UTILIZADAS.

2.1 Cepas de *Aspergillus nidulans*.

Las cepas utilizadas en esta tesis doctoral se enumeran en la Tabla 1. Todas las estirpes portan la mutación *veA1* de pérdida de función en VeA (Velvet), que causa la conidiación profusa en presencia de luz⁵⁸. Los marcadores se describen en Clutterbuck

59

Tabla 1. Cepas de *Aspergillus nidulans* utilizadas en esta tesis doctoral.

Nombre	Genotipo	Origen
MAD782	<i>yA2, pabaA1, pyrG89</i>	Londres
MAD930	<i>yA2, pabaA1, areA^r366, pacC^c700, pprA1</i>	E.A.Espeso
MAD993	<i>yA2, pabaA1, areA^r366, pacC^c700, pacC+/-70015</i>	J.Fernández
MAD1055	<i>wA3, pyrG89, pyroA4</i>	FGSC
MAD1117	<i>yA2, pantoB100, argB2</i>	E.Espeso
MAD1176	<i>pyrG89, nudA1, chaA1</i>	V.Efimov
MAD1249	<i>wA3, pyroA4, ANnup42::gfp::pyrG^{Afum}</i>	S. Osmani
MAD1264	<i>wA3, pyroA4, pyrG89, rvs167::gfp::pyrG^{Afum}</i>	S. Osmani
MAD1266	<i>wA3, pyroA4, pyrG89, kapB::gfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD1304	<i>wA2, pyroA4, pyrG89, nic96::gfp::pyrG^{Afum}</i>	O.Etxebeeste
MAD1399	<i>yA2, pabaA1, pyrG89, abpA::mrfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD1407	<i>yA2, pabaA1, pyroA4, pyrG89, kapK^{LPI}::pyr4</i>	Este trabajo
MAD1420	<i>yA2, pabaA1, pyrG89, abpA::gfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD1425	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB</i>	B.Oklaey
MAD1524	<i>yA2, pabaA1, pyrG89, argB2, kapK::gfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD1536	<i>pyroA4, pyrG89, ΔnKuA::argB, kapK2</i>	Este trabajo
MAD1543	<i>yA2, pabaA1, pyrG89, argB2, kapA::mrfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD1545	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB, kapA31</i>	Este trabajo
MAD1636	<i>pabaA1, gpdA^p::nirA::gfp</i>	J.Strauss
MAD1637	<i>yA2, pabaA1, pyroA4, argB2, gpdA^p::nirA::gfp, ΔnplA::argB</i>	J.Strauss
MAD1639	<i>yA2, pabaA1, pyroA4, riboA, argB2, aclA^p::mrfp::nplA::gfp, ΔnplA::argB</i>	J.Strauss
MAD1794	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB, slaB::gfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD1795	<i>pabaA1, slaB::gfp::pyrG^{Afum}, abpA::mrfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD1796	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB, napB::gfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD1797	<i>yA2, pantoB100, argB2, /alcA^p::NLS::gfp/argB</i>	Este trabajo

MAD1798	<i>yA2, pantoB100, argB2, /alcA^P::NLS::NES::gfp/argB</i>	Este trabajo
MAD1799	<i>wA3, pyroA4, pyrG89, argB2, /alcA^P::cNLS::gfp/argB, kapK1</i>	Este trabajo
MAD1800	<i>wA3, pyroA4, pyrG89, argB, /alcA^P::NLS::NES::gfp/argB, kapK1</i>	Este trabajo
MAD1802	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB, ΔabpA::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD1810	<i>wA3, biA1, argB::trpC, riboB2, ΔnplA::argB</i>	J. Strauss
MAD2023	<i>tubA::gfp, pyrG89, Sc/2, choA1, chaA1</i>	B. Oklaey
MAD2044	<i>abpA::mrfp::pyrG^{Afum}, rvs167::gfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD2046	<i>pyroA4, kapK::gfp::pyrG^{Afum}, ΔnplA::argB</i>	Este trabajo
MAD2047	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB, nup42like::mrfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD2048	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB, [Zn+CC]::gfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD2049	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB, nplA::mrfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD2149	<i>pyroA4, pyrG89, nudK317, kapA::mrfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD2150	<i>pabaA1, nudA1, kapA::mrfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD2151	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB, napBΔnls::gfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD2152	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB, kapA31, napB::gfp::pyrG^{Afum}</i>	Este trabajo
MAD2153	<i>pyroA4, kapA31, alcA^P::NLS::gfp</i>	Este trabajo
MAD2154	<i>pantoB100, kapA31, alcA^P::NLS::NES::gfp</i>	Este trabajo
MAD2155	<i>pabaA1, pyrG89, areA⁺366, choA1, tubA::gfp, pprA1</i>	Este trabajo
MAD2156	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnKuA::argB, pRG3-NotI-pyr4-[Myc₃::NplA::(HA)₃]</i>	Este trabajo
TRMD3.4.17	<i>pyroA4, veA::gfp::pyrG^{Afum}</i>	A. Calvo
TA773.B13	<i>pyroA4, veA1::gfp::pyrG^{Afum}</i>	A. Calvo
nirA::GFPKapK1	<i>wA2, pabaA1, pyroA4, gpdAp::nirA::gfp, kapK1</i>	J. Strauss
pyrG89	<i>pyroA4, pyrG89, riboA1</i>	FGSC

2.2 Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

En este trabajo, para estudiar la localización nuclear de proteínas fusionadas a GFP se han utilizado las cepas proporcionadas por el Dr. Nomura W303-1a (MAT α , *ade2-10*, 112 *his3-11*, *trp1-1*, *leu2-3*, *ura3-1*, *can1-100*) y *srp1-31* (mutante termosensible en el fondo genético de W303-1a, con la sustitución S116F en la proteína que codifica el gen *srp1*/Importina α ⁶⁰). En los ensayos de doble híbrido se han utilizado las cepas Y187 (MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *gal4Δ*, *met⁻*, *gal80Δ*, URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-*lacZ*, MEL1) y AH109 (MAT α , *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, LYS⁺::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-

HIS3, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ, MEL1) de Clontech.

2.3 Cepas de *Escherichia coli*.

En este trabajo se han utilizado las estirpes de *E. coli* DH1 (F-,recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17, supE44) y DH5 α F' (F', endA1, hsdR17, supE44, thi1, recA1, gyrA, relA1, Δ (lacIZYA-argF), U169, deoR, (ϕ 80dlac Δ (lacZ)M15)) del tipo K-12 (las mutaciones de *E. coli* se describen en la referencia ⁶¹). Las estirpes DH1 y DH5 α -F' se han utilizado como cepas de alta frecuencia de transformación, y en especial DH5 α -F' para la selección de plásmidos recombinantes utilizando LacZ como marcador de selección.

3. VECTORES UTILIZADOS.

A continuación se detallan los plásmidos utilizados en esta Tesis. Cuando fue necesario se verificó la correcta inserción de mutaciones y epítomos mediante secuenciación automática del DNA. Los oligonucleótidos empleados en su construcción se detallan en la Tabla 2. En los pasos intermedios de construcción de alguno de estos vectores se ha empleado el plásmido pBlueScript-SK+ de Stratagene. En el clonaje y propagación de fragmentos de PCR se han utilizados los vectores comerciales pCR2.2-TOPO de Invitrogen (Ref. K4500-01) y pGEM-Teasy de Promega (Ref. A1360).

3.1 Plásmidos utilizados en *A. nidulans*.

- **palcA-NLS y palcA-NN:** Plásmidos portadores de las quimeras NLS::GFP y NSL::NES::GFP para su expresión bajo el promotor alcA^p. El fragmento con la NLS del antígeno T grande de SV40 se obtuvo del plásmido pRS323 que contiene la construcción NLS::GFP::PacC ⁶² mediante amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos NLS-Eco y GFPstopEco. El fragmento resultante, que codifica para la quimera NLS::GFP, fue digerido con *EcoRI* e introducido en el sitio *EcoRI* de pBlueScript-SK+, dando como resultado el plásmido pBS-NGFP. La secuencia codificante de la NES de PKI- α se obtuvo mediante el alineamiento de los oligonucleótidos NES1 y NES2 siguiendo el protocolo descrito en Orejas et al. ⁶³. El fragmento resultante contenía en sus extremos sitios de restricción para *BamHI*. El plásmido pBSNNGFP se consiguió introduciendo el fragmento codificante de la NES

en el sitio *BamHI* del plásmido pBSNGFP, localizado entre la NLS y la GFP. Los plásmidos palcA-NN y palcA-NLS se obtuvieron por la inserción del fragmento *EcoRI* de pBS-NNGFP y pBS-NGFP, respectivamente, en el plásmido palcA1⁶⁴. Para prevenir posibles mutaciones se utilizó la enzima Pfu (Promega) y se secuenciaron las construcciones generadas. Los plásmidos palcA-NN y palcA-NLS fueron transformados en la cepa MAD1117 de *A. nidulans*.

- **pKAPK1:** Plásmido utilizado para generar el alelo mutante *kapK1*. Utilizando los oligonucleótidos kapk-1 y kapk-2 se amplificó el gen *kapK*, a partir de DNA genómico, desde el sexto codón hasta 500 pb corriente abajo del codón stop. Esta versión truncada de *kapK* se introdujo en el plásmido pCR2.1-TOPO. El plásmido resultante, denominado pG5KAPK, se utilizó para realizar la mutagénesis dirigida. Los oligonucleótidos T520C-F y T520C-R, que llevan el cambio T525C, más un nucleótido modificado que genera un sitio de estricción para *StuI*, fueron utilizados para mutar la secuencia de *kapK*. Se analizó la presencia del sitio de restricción *StuI* en diferentes clones y se secuenciaron para confirmar la presencia de la mutación. Para facilitar futuros trabajos en *A. nidulans*, se introdujo un fragmento con el gen *pyr-4* de *Neurospora crassa* en el sitio *BglII* del plásmido pG5KAPKmut. El plásmido resultante, con el gen *pyr-4* en la misma orientación que el gen *kapK* mutante, denominado pKAPK1, fue introducido en la cepa de *A. nidulans* MAD1055.

- **pKAPA31:** Plásmido utilizado para generar el alelo mutante *kapA31*. Utilizando los oligonucleótidos $\alpha 15$ y $\alpha 13B$ se amplificó el gen *kapA*, a partir de DNA genómico, desde el cuarto codón hasta 1.500pb corriente abajo del codón stop. Esta versión truncada de *kapA* se introdujo en el plásmido pCR2.1-TOPO. El plásmido resultante se utilizó para realizar la mutagénesis dirigida. Los oligonucleótidos $\alpha 31UP$ y $\alpha 31DW$ fueron utilizados para mutar la secuencia de *kapA* generando el cambio S111P en la proteína. La presencia de la mutación se confirmó mediante secuenciación. Por último, se introdujo un fragmento con el gen *pyr-4* de *Neurospora crassa* en el sitio de restricción *BamHI* del plásmido pCR2.1-TOPO. El plásmido resultante, portando el gen *pyr-4* en la misma orientación que el gen *kapA* mutante, denominado pKAPA31, fue introducido en la cepa de *A. nidulans* MAD1425.

- **pRG3-NotI-pyr4-[Myc₃::NplA::(HA)₃]:** Es un derivado del plásmido autorreplicativo pRG3-AMA1-NotI (p1393). Mediante la técnica de PCR de fusión (ver apartado 4.3) se generó un fragmento formado por la región 5'UTR del gen *nplA*, la

región codificante de *nplA*, el epítipo (HA)₃ y la región 3'UTR de *nplA*. Este fragmento se introdujo en el vector pGEM-TEasy (Promega) siendo posteriormente escindido como un fragmento *NotI-NotI* para introducirlo en el único sitio *NotI* del plásmido pBlueScript-SK+. El plásmido recombinante se utilizó como molde para realizar una mutagénesis dirigida, utilizando técnicas de PCR y los oligonucleótidos NplANco-1 y NplANco-2, para introducir un sitio de restricción *NcoI* entre el promotor y la región codificante de *nplA*. En este sitio de restricción se introdujo un fragmento que codificaba para tres copias en tandem del epítipo Myc (Myc₃). El plásmido pRG3-*NotI-pyr4*-[Myc₃::NplA::(HA)₃] se obtuvo al introducir el fragmento [Promotor-Myc₃::NplA::(HA)₃-Terminador] en el sitio *NotI* del plásmido p1393.

3.2 Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas en *Saccharomyces cerevisiae* y ensayos de doble híbrido.

- **pRS323 (p1366):** Este plásmido fue construido por el Dr. Javier Fernández-Martínez, introduciendo el terminador de ADH1 procedente del plásmido comercial pACT2-AD (Clontech) como un fragmento *BglII/NotI* en las dianas del plásmido centromérico pRS313⁶⁵. Se utilizó para expresar proteínas con GFP fusionada a su extremo amino-terminal bajo el control del promotor ADH1 en *S. cerevisiae* con el fin de analizar su localización subcelular.

- **pRS323[ADH1p::GFP::napB]:** Este plásmido fue construido amplificando por PCR y con los oligonucleótidos ADH1-F y ADH1-R (Tabla 2) el promotor de ADH1 a partir del plásmido comercial pACT2-AD (Clontech). Los oligonucleótidos añaden un sitio de restricción *XhoI* en el extremo 5' y un sitio de restricción *BamHI* en el extremo 3'. El promotor se introdujo en el plásmido pBlueScript-SK+ como fragmento *XhoI/BamHI* (plásmido pBS-ADH1prom). El DNA codificante del gen *napB* fue amplificado utilizando los oligonucleótidos nap3 y nap4, que introducen sitios de corte para las enzimas de restricción *BamHI* y *EcoRI* respectivamente. Este fragmento fue introducido tras el promotor ADH1 en el plásmido pBS-ADH1prom. A continuación se introdujo el fragmento *BamHI* que expresaba GFP, obtenido a partir del plásmido p1153⁶⁶, en el mismo sitio de restricción presente entre el promotor y el cDNA de *napB*. Todo el transgén se escindió de pBlueScript-SK+ como un fragmento *XhoI/EcoRI* y se introdujo en las mismas dianas de restricción en el plásmido pRS323.

- **pAMCA.1GFP**: Plásmido utilizado para expresar la proteína GFP::VeA en *S. cerevisiae*. El cDNA del gen *veA* fue amplificado utilizando los oligonucleótidos 79YGFPWTF y 80YGFP^RSmaI, que introducen sitios de corte para las enzimas de restricción *Pst*I y *Sma*I, respectivamente. Este fragmento fue introducido tras el promotor ADH1 en el plásmido pBS-ADH1prom. A continuación se introdujo el fragmento *Bam*HI que expresaba GFP en el mismo sitio de restricción presente entre el promotor y el cDNA de VeA. Todo el transgén se escindió de pBlueScript-SK+ como un fragmento *Xho*I/*Eco*RV y se introdujo en las mismas dianas de restricción en el plásmido pRS323.

- **pAMCA.2GFP**: Plásmido utilizado para expresar la proteína NLS::GFP::VeA en *S. cerevisiae*. Se construyó de forma idéntica a **pAMCA.1GFP** salvo que tras la secuencia del promotor de ADH1 se encontraba la secuencia codificante para la NLS monopartita del antígeno T del virus SV40.

- **pAMC43GFP**: Plásmido utilizado para expresar la proteína GFP::VeA_{ΔNLS} en *S. cerevisiae*. Construido de forma idéntica a **pAMCA.1GFP** salvo que la versión truncada del gen *veA*_{ΔNLS} fue amplificado utilizando los oligonucleótidos 97YGFPΔNLS y 80YGFP^RSmaI.

- **pAMC45GFP**: Plásmido utilizado para expresar la proteína NLS::GFP::VeA_{ΔNLS} en *S. cerevisiae*. Se construyó de forma idéntica a **pAMC43GFP** salvo que tras la secuencia del promotor de ADH1 se encontraba la secuencia codificante para la NLS monopartita del antígeno T del virus SV40.

- **pAMC52.12GFP**: Plásmido utilizado para expresar la proteína GFP::VeA1 en *S. cerevisiae*. Construido de forma idéntica a **pAMCA.1GFP** salvo que la versión truncada del gen *veA*1 fue amplificada utilizando los oligonucleótidos 110YGFP y 80YGFP^RSmaI.

- **pAMC53.NLS2GFP**: Plásmido utilizado para expresar la proteína NLS::GFP::VeA1 en *S. cerevisiae*. Se construyó de forma idéntica a **pAMC52.12GFP** salvo que tras la secuencia del promotor de ADH1 se encontraba la secuencia codificante para la NLS monopartita del antígeno T del virus SV40.

- **pGADT7-KapK**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{AD}::KapK. El cDNA de *kapK* fue amplificado con los oligonucleótidos kapk8 y kapk9 que introducen sitios de corte para *Nde*I y *Xba*I,

respectivamente. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGADT7rec (Clontech) digiriendo ambos, plásmido y fragmento, con las enzimas de restricción *NdeI* y *XbaI*.

- **pGBKT7-KapK_[1-1072]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::KapK_[1-1072]. El cDNA de *kapK*_[1-1072] fue amplificado con los oligonucleótidos 1kapkFNdeI y 5kapkRSmaI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *SmaI*. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGBKT7 (Clontech) en las mismas dianas de restricción.

- **pGBKT7-KapK_[1-697]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::KapK_[1-697]. El cDNA de *kapK*_[1-697] fue amplificado con los oligonucleótidos 1kapkFNdeI y 4kapkRSmaI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *SmaI*. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGBKT7 en las mismas dianas de restricción.

- **pGBKT7-KapK_[224-1072]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::KapK_[224-1072]. El cDNA de *kapK*_[224-1072] fue amplificado con los oligonucleótidos 2kapkFNdeI y 5kapkRSmaI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *SmaI*. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGBKT7 en las mismas dianas de restricción.

- **pGBKT7-KapK_[449-1072]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::KapK_[449-1072]. El cDNA de *kapK*_[449-1072] fue amplificado con los oligonucleótidos 3kapkFNdeI y 5kapkRSmaI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *SmaI*. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGBKT7 en las mismas dianas de restricción.

- **pGBKT7-KapK_[224-697]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::KapK_[224-697]. El cDNA de *kapK*_[224-697] fue amplificado con los oligonucleótidos 2kapkFNdeI y 4kapkRSmaI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *SmaI*. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGBKT7 en las mismas dianas de restricción.

- **pGBKT7-KapK_[1-255]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::KapK_[1-255]. Este plásmido se obtuvo tras digerir el pGBKT7-KapK_[1-697] con la enzima de restricción *PstI*, eliminando un fragmento de 1459pb de la región 3' del cDNA de *kapK*_[1-697].

- **pGADT7-NplA_[1-512]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{AD}::NplA_[1-512]. El cDNA de *nplA*_[1-512] fue amplificado con los oligonucleótidos 1nplAFNdeI y 7nplARBamHI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGADT7 (Clontech) en las mismas dianas de restricción.

- **pGADT7-NplA_[1-380]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{AD}::NplA_[1-380]. El cDNA de *nplA*_[1-380] fue amplificado con los oligonucleótidos 1nplAFNdeI y 5nplARBamHI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGADT7 en las mismas dianas de restricción.

- **pGADT7-NplA_[381-512]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{AD}::NplA_[381-512]. El cDNA de *nplA*_[381-512] fue amplificado con los oligonucleótidos 6nplAFNdeI y 7nplARBamHI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGADT7 en las mismas dianas de restricción.

- **pGADT7-NplA_[24-512]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{AD}::NplA_[24-512]. El cDNA de *nplA*_[24-512] fue amplificado con los oligonucleótidos 2nplAFNdeI y 7nplARBamHI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGADT7 en las mismas dianas de restricción.

- **pGADT7-NplA_[1-177]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{AD}::NplA_[1-177]. El cDNA de *nplA*_[1-177] fue amplificado con los oligonucleótidos 1nplAFNdeI y 3nplARBamHI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGADT7 en las mismas dianas de restricción.

- **pGADT7-NplA_[178-512]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{AD}::NplA_[178-512]. El cDNA de *nplA*_[178-512] fue amplificado con los oligonucleótidos 4nplAFNdeI y 7nplARBamHI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGADT7 en las mismas dianas de restricción.

- **pGADT7-NplA_[178-380]**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{AD}::NplA_[178-380]. El cDNA de *nplA*_[178-380] fue amplificado

con los oligonucleótidos 4nplAFNdeI y 5nplARBamHI que introducen sitios de corte para *NdeI* y *BamHI*, respectivamente. El fragmento resultante se introdujo en el plásmido comercial pGADT7 en las mismas dianas de restricción.

- **pACT2-KapA⁵⁰**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{AD}::KapA⁵⁰. El cDNA de *kapA*⁵⁰, que codifica desde el aminoácido 83 hasta el 551, se amplificó con los oligonucleótidos $\alpha 5$ y $\alpha 6$ y se clonó en TOPO. Este fragmento se extrajo como *NcoI/NcoI* y se introdujo en la misma diana de restricción de pACT2 (Clontech).

- **pGBKT7-NapB**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::NapB. El cDNA de *napB* fue amplificado con los oligonucleótidos nap-Eco y nap-Bam que introducen sitios de corte para *EcoRI* y *BamHI*, respectivamente. Este fragmento se introdujo como *EcoRI/BamHI* en el plásmido comercial pGBKT7. El plásmido resultante se utilizó también en los sistemas de expresión *in vitro*.

- **pGBKT7-nKu70**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::nKu70. El cDNA de *nku70* fue amplificado con los oligonucleótidos ku70-Eco y ku70-Bam que introducen sitios de corte para *EcoRI* y *BamHI*, respectivamente. Este fragmento se introdujo como *EcoRI/BamHI* en el plásmido comercial pGBKT7. El plásmido resultante se utilizó también en los sistemas de expresión *in vitro*.

- **pGBKT7-Hsp70**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::Hsp70. El cDNA de *hsp70* fue amplificado con los oligonucleótidos hsp70-Eco y hsp70-Bam que introducen sitios de corte para *EcoRI* y *BamHI*, respectivamente. Este fragmento se introdujo como *EcoRI/BamHI* en el plásmido comercial pGBKT7. El plásmido resultante se utilizó también en los sistemas de expresión *in vitro*.

- **pGBKT7-Hsp90**: Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::Hsp90. El cDNA de *hsp90* fue amplificado con los oligonucleótidos hsp90-Eco y hsp90-Bam que introducen sitios de corte para *EcoRI* y *BamHI*, respectivamente. Este fragmento se introdujo como *EcoRI/BamHI* en el plásmido comercial pGBKT7. El plásmido resultante se utilizó también en los sistemas de expresión *in vitro*.

- **pGBKT7-NudK:** Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::NudK. El cDNA de *nudK* fue amplificado con los oligonucleótidos nudk-2 y nudk-3 que introducen sitios de corte para *EcoRI*. Este fragmento se introdujo como *EcoRI/EcoRI* en el plásmido comercial pGBKT7. El plásmido resultante se utilizó también en los sistemas de expresión *in vitro*.

- **pAMC46:** Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::VeA. El cDNA de *veA* fue amplificado con los oligonucleótidos 92YWTF y 95YR que introducen sitios de corte para *NcoI* y *PstI*. Este fragmento se introdujo como *NcoI/PstI* en el plásmido comercial pGBKT7. El plásmido resultante se utilizó también en los sistemas de expresión *in vitro*.

- **pAMC47:** Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::VeA_{ΔNLS}. El cDNA de *veA*_{ΔNLS} fue amplificado con los oligonucleótidos 93YΔNLSF y 95YR que introducen sitios de corte para *NcoI* y *PstI*. Este fragmento se introdujo como *NcoI/PstI* en el plásmido comercial pGBKT7. El plásmido resultante se utilizó también en los sistemas de expresión *in vitro*.

- **pAMC49:** Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::VeA_[186-573]. Este plásmido fue generado mediante la digestión del plásmido pAMC46 con *EcoRI* y posterior ligación de los extremos *EcoRI* del fragmento correspondiente al plásmido.

- **pAMC54:** Plásmido utilizado en los ensayos de doble híbrido para expresar la fusión Gal4^{DBD}::VeA1. El cDNA de *veA1* fue amplificado con los oligonucleótidos 109YveA1d y 95YR que introducen sitios de corte para *NdeI* y *PstI*. Este fragmento se introdujo como *NdeI/PstI* en el plásmido comercial pGBKT7. El plásmido resultante se utilizó también en los sistemas de expresión *in vitro*.

3.3 Plásmidos utilizados para la expresión de proteínas *in vitro* y en *E. coli*.

- **pGEX-2T (p20):** Plásmido comercial de la casa Pharmacia. Se utilizó para la expresión en *E. coli* de la proteína Glutathion S-Tranferasa (GST) sola o fusionada al extremo amino de la proteína de interés.

- **pGEX-2T[NapB]:** Plásmido utilizado para la expresión en *E. coli* de la proteína GST::NapB. El cDNA de *napB* se amplificó con los oligonucleótidos nap3 y

nap4 que introducen sitios de corte para *Bam*HI y *Eco*RI, respectivamente. Este fragmento se introdujo como *Bam*HI/*Eco*RI en el plásmido pGEX-2T.

- **pGEX-2T[NapB_{ΔNLS}]**: Plásmido utilizado para la expresión en *E. coli* de la proteína GST::NapB_{ΔNLS}. El cDNA de *napB*_{ΔNLS} se amplificó con los oligonucleótidos nap3 y nap4_{ΔNLS} que introducen sitios de corte para *Bam*HI y *Eco*RI, respectivamente. Este fragmento se introdujo como *Bam*HI/*Eco*RI en el plásmido pGEX-2T.

- **pGEX-2T[NapA]**: Plásmido utilizado para la expresión en *E. coli* de la proteína GST::NapB. El cDNA de *napA* se amplificó con los oligonucleótidos napUP y napDW que introducen sitios de corte para *Bam*HI y *Eco*RI, respectivamente. Este fragmento se introdujo como *Bam*HI/*Eco*RI en el plásmido pGEX-2T.

- **pGEX-2T[PacC(305-678)]**: Plásmido construido por el Dr. Eduardo A. Espeso para la expresión en *E. coli* de la proteína PacC(305-678).

- **pQE80zz**: Este plásmido es un derivado del plásmido pQE80 (Qiagen) (Cedido por el Dr. Jose Manuel Mingot). Permite expresar proteínas añadiéndoles en su extremo amino dos dominios Z (dominio de unión a IgG de la proteína A de *Staphylococcus aureus*) y una diana de corte para la proteasa Tev, y en su extremo carboxilo terminal una cola de seis histidinas. Se utilizó para expresar la forma KapA⁵⁰ de la Importina α de *A. nidulans* fusionada a los dominios Z y a la cola de histidinas en *E. coli*.

- **pQE80zz[KapA⁵⁰]**: Este plásmido se utilizó para expresar en *E. coli* la proteína ZZ::KapA⁵⁰. Para construirlo se amplificó el cDNA de *kapA* con los oligonucleótidos α 1 y α 4. El producto de PCR se clonó en pCR2.1-TOPO y se comprobó mediante secuenciación. El fragmento *kapA*⁵⁰, que codifica desde el aminoácido 83 al 551 se amplificó por PCR con los oligonucleótidos α 5 y α 6 y se introdujo en el plásmido pCR2.1-TOPO (Invitrogen) del cuál se escindió con una digestión *Bam*HI y se introdujo en el plásmido pQE80zz para generar el plásmido pQE80zz[KapA⁵⁰].

- **pGADT7-Rec- Δ ADH1Gal4[KapB]** (p1616): Este plásmido, construido por el Dr. Javier Fernández-Martínez, se utilizó para expresar *in vitro* KapB. Para construirlo se amplificó el cDNA de *kapB* con los oligonucleótidos karB3' y karB5' y se introdujo en pCR2.1-TOPO. Una vez verificada la ausencia de mutaciones en la secuencia de nucleótidos de *kapB* se volvió a amplificar esta región codificante con los

oligonucleótidos SM-KapB y CDS-KapB que añaden a los extremos del cDNA las regiones de recombinación SMART III y CDS III. El fragmento se insertó en el plásmido pGADT7-Rec- Δ ADH1Gal4 mediante la técnica de “gap-repair” en la levadura.

• **TOPO-KapG:** Este plásmido se utilizó para expresar *in vitro* el transportador KapG. Para construirlo se amplificó el cDNA de *kapG* con los oligonucleótidos kapG1 y kapG2 y se introdujo en pCR2.1-TOPO.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis doctoral.

Nombre del oligonucleótido	Secuencia 5'-3'
kapk-1	TTACGAAGGCAAGGGTGAATTGGTACG
kapk-2	ACAACAGTAACGGGTATACGTGTGGC
kapk-11	AGCCATATCCTGGACAC
kapk-e	GTGACAAGTGATAGTGACCAGCAATGATCC
kapk-f	TCTATCGCAGAGGCTTGGGTAAAGTCGTAT
pyrG-kapk	ATACGACTTTACCCAAGCCTCTGCGATAGAACCGG TCGCCTCAAACAATGCTCT
GFP-kapk2	GTCAGTCTCGGATTTTCAGTTCTTCATCGAGGTCTGAG AGGAGGCACTGATGCG
kapk-c	CTCGATGAAGAACTGAAATCCGAGACTGAC
kapk-d	GCATCTTTTCGTATGCATTGGGACTAGGCT
kapk-g	CGACTGACTACTTGAGGACG
kapk-h	GTCCGTCTCATTTTCTCC
T520C	GACCTTTTGGGCTCTGTGAAATGAAGAGAGGG ⁽¹⁾
T520C-R	CCCTCTCTTCATTTTCACAGAGGCCCAAAGGTC ⁽¹⁾
NLS-Eco	GAATTCATGGATAAAGCGGAATTAATTCC
GFPstopEco	GCGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTC
NES1	GATCAAATGAACTGGCTCTTAAATTGGCCGGACTCGACAT CAACAAGACAGAGC ⁽²⁾
NES2	GATCGCTCTGTCTTGTTGATGTCGAGTCCGGCCAATTTAAG AGCCAGTTCATTT ⁽²⁾
kapk-8	GCCATATGTCTGTCTCTATACAGGA ⁽³⁾
kapk-9	GCTCTAGATCATAGCTCATCATCATGG ⁽⁴⁾
kapk-b	TAGCTCATCATCATGGTCCATTTCCGAAGG
GFPkapk1	CCTTCGGAAATGGACCATGATGATGAGCTAGGAGCTGGTG CAGGCGCTGGAGCC
1nplAFNdeI	ACATATGATGGTTGTCTGCACATATTTT ⁽³⁾
2nplAFNdeI	ACATATGCCTCGCTCACAACAGACAT ⁽³⁾
4nplAFNdeI	ACATATGGTGGGGCAGACATCAGCA ⁽³⁾
3nplARBamHI	AGGATCCTGCTGATGTCTGCCCCAC ⁽²⁾
5nplARBamHI	AGGATCCATTTGGATTGAACCACCAGC ⁽²⁾
6nplAFNdeI	ACATATGGCTGGTGGTTCAATCCAAAT ⁽³⁾
7nplARBamHI	AGGATCCCTAGAAGTCAAACTAACCCA ⁽²⁾

1kapkFNdeI	ACATATGATGTCTGTCTCTATACAGGA ⁽³⁾
2kapkFNdeI	ACATATGACGCCCCGTCATAAATACCC ⁽³⁾
3kapkFNdeI	ACATATGTTCGTTAAAGAAAGCGACAC ⁽³⁾
4kapkRSmaI	ACCCGGGCGAGCAGGCTGCGACATT ⁽⁵⁾
5kapkRSmaI	ACCCGGGTCATAGCTCATCATCATGGT ⁽⁵⁾
nplA1	CGACGATGCCATCTACCAGAAAAGTACAGG
nplA2	CTTGATGATATCGATCCTATTTCGGATGTTC
nplA3	GAACATCCGAATAGGATCGATATCATCAAGGGAGCTGGTGC AGGCGCTGGAGCC
nplA4	AAACCGAGGTTAATGCCTTGATTTTCAGTTCTGTCTGAGAGG AGGCACTGATG
nplA5	AACTGAAAATCAAGGCATTAACCTCGGTTT
nplA6	AGCAACAGGATCCATGCATCTAGGTAGAGC
nplA7	CCTAAGACGGAATGGGTAGTTTTGACTTCGGAGCTGGTGCA GGCGCTGGAGCC
nplA8	GAAGTCAAACTAACCCATTCCGTCTTAGG
nplA9	ATGGGCGACACAGGCTCCGGCGTGGGGCAG
nplA10	CTGCCCCACGCCGGAGCCTGTGTCGCCCATATTCCTC AACCTGCCACAAAGC
HANplA-1	GTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGAAACTGAAAATCAAGGC ATTAACCTCGG
HANplA-2	CCGAGGTTAATGCCTTGATTTTCAGTTTCACTGAGCAGCGT AATCTGGAAC
NplA-Nco1	GTTGAGTGACCATGGTTGTCTGC ⁽⁶⁾
NplA-Nco2	CAGACAACCATGGTCACTCAACC ⁽⁶⁾
karB3'	AGATCTCCATGGATGTCACTCAAGTGTG
karB5'	AGATCTCTTATGACATTCCACCACCC
α 1	GTTCCCTCACCTCAGCAACCATGG
α 4	ATTGAAGCCACAATCCACCCGCC
α 15	CGCTATATCCCAGAGCATCGC
α 13B	CTAAGTCCGATGAGAGGATTGGCG
imp5	CAATAGGCTTCTCTTCGAGCTAGCAACTGC
imp6	TGAAGGGTGGAAGAAGGTGATGAAGATAG
imp-pyrG	CTATCTTCATCACCTTCTTTCCACCCTTCAACCGGTCGCC TCAAACAATGCTCT
imp-GFP2	CCTTCATTAAAGCTTTTGATTCTGGCTTTCGTCTGAGAGG AGGCACTGATGCG
imp3	GAAAGCCAGAATCAAAAGCTTAAATGAAGG
imp4	ACACAGACTAAGTCCGATGAGAGGATTGGC
imp7	CATCCGTTTCTTGATATCG
imp8	GAACCAAATCACAATCCG
α 31UP	CAGAAAGCTCCTCTTCAAGGAACGTAACC ⁽⁷⁾
α 31DW	GGTTACGTTCCCTTGAAGAGGAGCTTTCT ⁽⁷⁾
Bgsp1	AGCGTACTATTCTATGCAGCAACAGGTCG
Bgsp2	TGACATTCCACCACCCTGCATGTTGATCTG
Bgsp3	GACACTCTTGCCCAAACGATCCATATGGTC
Bgsp4	CCATTGAGTCCTTGTACTTGAGAGTTCTGC
BGFP1	CAGATCAACATGCAGGGTGGTGGAATGTCAGGAGCTGGT

	GCAGGCGCTGGAGCC
BGFP2	GACCATATGGATCGTTTGGGCAAGAGTGTCTGAGAGG AGGCACTGATGCG
imp1	TTTGCCTGTTTCATTCGACACCATGTCCG
imp2	CATATCCATGGAATCGCCGCCATTGGCACC
impGFP1	GGTGCCAATGGCGGCGATTCCATGGATATGGGAGCTGGTG CAGGCGCTGGAGCC
$\alpha 5$	GCGGATCCGAGTTACCAGAGATGGTC ⁽²⁾
$\alpha 6$	GCGGATCCCATATCCATGGAATCGCC ⁽²⁾
Ku70-Eco	GCGAATTCATGCTTCAGCCCCG ⁽⁸⁾
Ku70-Bam	GCGGATCCCTAGAACTTCGTCTC ⁽²⁾
napB-Eco	GCGAATTCATGTCGAACGACCAGC ⁽⁸⁾
napB-Bam	GCGGATCCTTAGACCTTGGCCTTC ⁽²⁾
Hsp70-Eco	GCGAATTCATGGCCCCCGCTGTTG ⁽⁸⁾
Hsp70-Bam	GCGGATCCTTAGTCGAGCTCCTCG ⁽²⁾
Hsp90-Eco	GCGAATTCATGGCCTCTGAGACC ⁽⁸⁾
Hsp90-Bam	GCGGATCCCTAGTCAACCTCCTCC ⁽²⁾
nudK-2	GCGAATTCCTTAAGCAAACCTCCG ⁽⁸⁾
nudK-3	GCGAATTCATGACCGAGGCTACTC ⁽⁸⁾
nap1	CACATTTACGCCAGACC
nap2	GGGCTGTGAATTGCTCG
nap3	GCGGATCCATGGCGAACGACCAGC ⁽²⁾
nap4	GCGAATTCCTTAGACCTTGGCCTTC ⁽⁸⁾
napUP	CGGGATCCATGTCTGAGCCCATCAGG ⁽²⁾
napDW	GCGAATTCAACTTTGCTTGCACTCAGC ⁽⁸⁾
KapG1	ATGGAGCACGAGCTTCTCAG
KapG2	ATTCATTCCCAGACTCCGC
SM-kapB	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTAT GGCCCATGGATGTCACTCAAGTGTTGG
CDS-kapB	TCTAGTGGCCGAGGCGGCCGACATGTTATGAC ATTCCACCACCC
napB1	CCAGCAGAAGGATCTTG
napB2	GACCTTGGCCTTCTTGCGTGGGCGGGAGTC
napB3	ACGTCCAAAAGAGAATTCGAGCAATTCAC
napB4	GCTACGACTGTTGTGATTGG
napBGFP1	GACTCCCGCCACGCAAGAAGGCCAAGGTC GGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC
napBGFP2	GTGAATTGCTCGAAATTCTCTTTTGGACGTGT CTGAGAGGAGGCACTGATGCGT
napB2Dnls	GCGGGAGTCTTCCTCTTCTTCGTCCTCG
napBDnlsGFP1	CGAGGACGAAGAAGAGGAAGACTCCCGCGGAGCTGGT GCAGGCGCTGGAGCC
napB4Dnls	GCGAATTCAGCGGGAGTCTTCCTCTTCTTCG
nimE1	GCGGATCCATGAATGAAAACGACGAG ⁽²⁾
nimE2	GCGGATCCTTCGTTGTCTTTGATGGAG ⁽²⁾
79YGFPWTF	CATTTTGTGTTATCCCTGCAGGATG ⁽⁹⁾
97YGFP Δ NLS	CAAGCGCCTGCAGGATGGCTTGTGGTCAAGGTTC ⁽⁹⁾
110YGFP	TTGAATTCCTGCAGGATGCAGCAGCCCAAGCGCG ⁽⁹⁾

80YGFPR <i>Sma</i> I	CAAATAAACCCCGGGAGAATTCTTTTA ⁽⁵⁾
92YWTF	CCATCACCATGGCTACACTTGCAGC ⁽⁶⁾
93YΔNLSF	GCGCGACCATGGCTTGTGGTCAAGGTTT ⁽⁶⁾
109YveA1d	GAGGACCTGCCATATGGCCATGCAGCAGCCCAAGCGCG ⁽³⁾
95YR	GGCAGAGACTGCAGTTAACGCATGGTGGCAG ⁽⁹⁾
VeAGFP1	CGGATGGTCTCAAAGCCTGCCACCATGCGTGGAGCTGG TGCAGGCGCTGGAGCC
VeAGFP2	AACTATGACAAATAAACGCCGGCAGAATTCGTCTGAGA GGAGGCACTGATGCG
VeAGSP1	GAATCGGATCCCCATGACGACAGCAATAAG
VeAGSP2	ACGCATGGTGGCAGGCTTTGAGACCATCCG
VeAGSP3	GAATTCTGCCGGCGTTTATTTGTCATAGTT
VeAGSP4	GAATGAGGACGCAATGGCTTTGCCGAAGCG
G7D	CGGACGACCTCAATCGACG
G7N	GAGACCCATACCTACCG
NpprA1	AAGCGGCCGCCTTGAGGTTGATGTCGG
NpprA2	GCGGATCCAGAGAGGCAGAAGGAATG
NpprA-pyrG	CATTCCTTCTGCCTCTCTGGATCCGCACCGGTCTGCC TCAAACAATGCTCT
pprAGFP2	GCTGAACAATGAGTTTAATGTACACAAATGGTCTG AGAGGAGGCACTGATGCG
pprA3	CATTTGTGTACATTAACTCATTGTTTCAGC
pprA4	GGAGACTATAGTAGACTATTGATGCTGCGG
Abp1	GGGTATTGTTCTCTGTTTCAACGCCCTTG
Abp2	ATCATCAAGCTGGACATAGTTCGCCGGA
Rfp1	TTTCCGGCGAACTATGTCCAGCTTGATGATGGAGCTG GTGCAGGCGCTGGAGCC
Rfp2	GCCCTGGGAGGCCGTTCCATATGATTCCTCGTCTGAG AGGAGGCACTGATGCG
Abp3	GAGGAATCATATGGAACGGCCTCCAGGGC
Abp4	GCCCACCCACACTGGCTGACCTGTGCTTAG
Abp5	CAACCTATCGGCCAATGGACCTTCG
Abp6	CCCGGTCTAGTCCCGCCCACTCC
cDNA1	CGAAGAGTTATCAGTCAGTGG
cDNA2	GCAGCAACAGTTTGAGTG
cDNA3	CTCTGCGATATAGTTCGAGC
cDNA4	CGTTCAGATAACAGCTCG
cDNA5	AGGTCGATATTGCTGCG
cDNA6	TACACTGGGAGAACCTGG
cDNA7	GCAGAGGATAACGAGGTAG
cDNA8	CTTGCTGGATACTGGTGG
P-abp1	GGGTGGCTATTCGGGTCTTTCGTTACTTCG
P-abp2	CTCCAAACAATTATCTTGTGACTGACAGCG
Abp-pyrG	CGCTGTCAGTCACAAGATAATTGTTTGGAGACCGGTCTG CCTCAAACAATGCTCT
AbpNulo1	TGCTCTGCTTGCTAACG
sla-1	ATATACCAAGAATAACGAGATGCGAAACGG
sla-2	ATCCTCCTGATAGGAAATCTTGCGCATTTT
sla-3	ATCACCGGCCCATGAATCCGGAGTAGTGGT

sla-4	GAACGGATACTTCAAGCCATCACAAGGAGG
slagfp1	GAAATGCGCAAGATTTCTATCAGGAGGATGGAGCTGG TGCAGGCGCTGGAGCC
slagfp2	ACCACTACTCCGGATTCATGGGCGGTGATGTCTGAGAG GAGGCACTGATGCG
Slaup	GTCTGTCGTTCTTACTTCGC
Sladw	CTGCACCACCACTACTCC
Slao13	AACAGCGTCTTGCTCAGG
Slao14	AGTCCCTCTGCACCTCG
SlaProm1	GCTACTAAGGAACCCAGGGATCTCG
SlaProm2	GTTCTGGGTGCGTACAGGG
SlaNuloPyrG	CCCTGTACGCACCCAGAACACCGGTGCGCTCAAACAATG CTCT
ADH1-R	GAATTCAAGGATCCCATCTTTGCAAAGCTTGG
ADH1-F	CCGAAACGCTCGAGGCAGCAAC

(1) En cursiva y subrayado se muestra el cambio de codón (TGT en lugar de ACG) que da lugar a la mutación *kap1* y la modificación para introducir un sitio de corte para la enzima de restricción *StuI*.

(7) En cursiva y subrayado se muestra el cambio de codón (TTC en lugar de TCC) para dar lugar a la mutación *kapA31*.

En el resto de oligonucleótidos en cursiva están indicados los sitios de restricción para: *BamHI* (2), *NdeI* (3), *XbaI* (4), *SmaI* (5), *NcoI* (6), *EcoRI* (8), *PstI* (9).

4. GENERACIÓN DE CASETES MEDIANTE PCRs DE FUSIÓN.

Los fragmentos de DNA utilizados para generar las cepas mutantes con los alelos nulos o que expresen proteínas fusionadas a GFP o mRFP fueron obtenidos mediante PCRs de fusión según el protocolo descrito por Yang et al.⁶⁷. A continuación se detallan las diferentes construcciones realizadas junto con los oligonucleótidos utilizados en cada caso (Tabla 2).

4.1 Construcciones utilizadas para la generación de alelos nulos.

En la figura 7A se muestra un esquema representativo del proceso seguido para generar los diferentes casetes de transformación, los cuales están compuestos por una región 5' no codificante de aproximadamente 1,5 kb (promotor) y una región 3' no codificante del mismo tamaño (terminador) del gen diana, ambas fusionadas al gen *pyrG* de *A. fumigatus*. En todos los casos cada fragmento de DNA fue amplificado por separado. Todas las construcciones se transformaron en la cepa MAD1425.

- ***ΔkapK***: La región correspondiente al promotor de *kapK* se amplificó con los oligonucleótidos *kapk-e* y *kapk-f*, la región correspondiente al terminador de *kapK* se

amplifico con los oligonucleótidos kapk-c y kapk-d, y el gen *pyrG*^{Afum} se amplificó con los oligonucleótidos pyrG-kapk y GFP-kap2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, kapk-e y kapk-d.

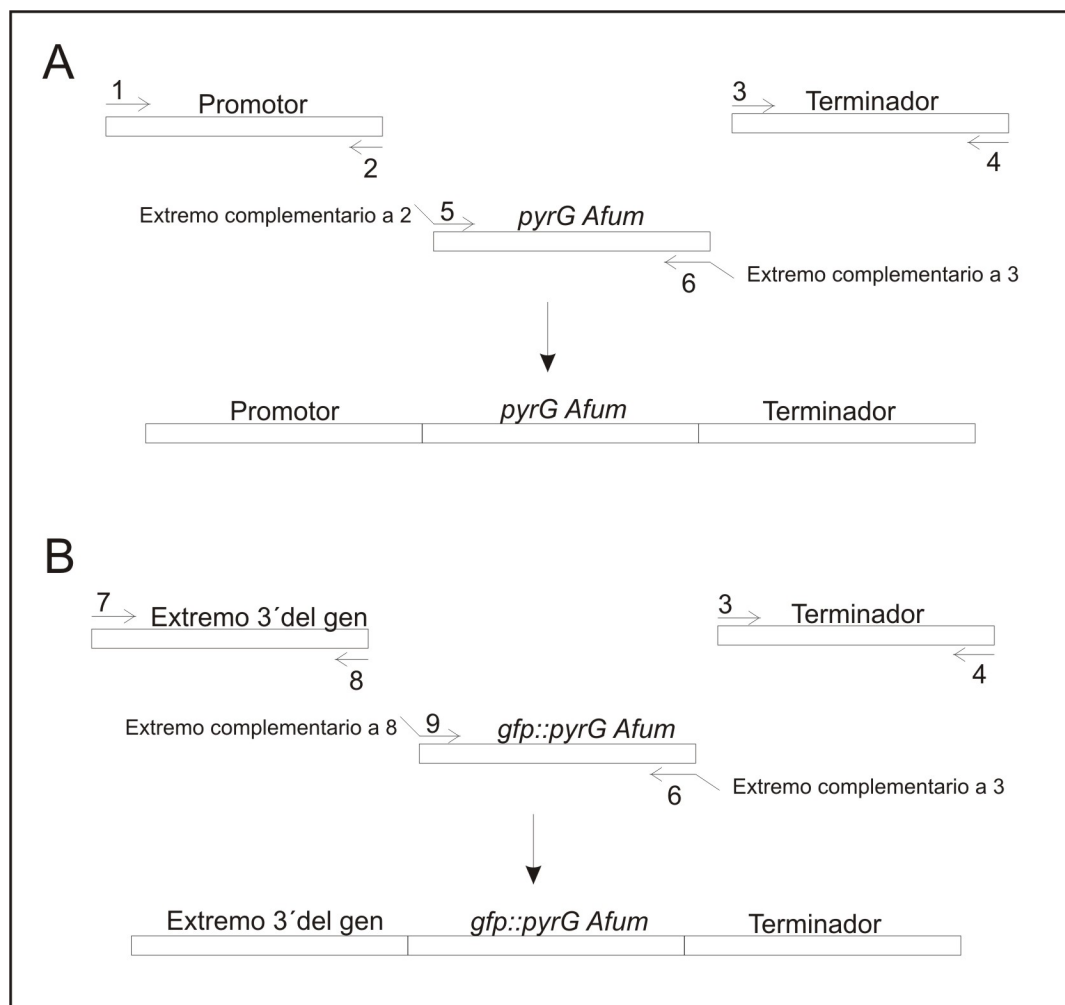


Figura 7: Estrategia para generar casetes de transformación mediante PCR de fusión. A) Casete para generar alelos nulos. **B)** Casete para generar formas etiquetadas. Cada uno de los fragmentos es amplificado por separado mediante PCR con una pareja de oligonucleótidos específicos (indicados con números del 1 al 9). El fragmento central, *pyrG*^{Afum} o *gfp::pyrG*^{Afum}, es amplificado con una pareja de oligonucleótidos que llevan una región complementaria a los fragmentos con los que se va a fusionar. Para la unión de los tres fragmentos se añaden a la reacción de PCR los oligonucleótidos de los extremos (1 y 4 en A, y 7 y 4 en B)

- ***ΔkapA***: La región correspondiente al promotor de *kapA* se amplificó con los oligonucleótidos imp5 e imp6, la región correspondiente al terminador de *kapA* se amplifico con los oligonucleótidos imp3 e imp4, y el gen *pyrG*^{Afum} se amplificó con los

oligonucleótidos pyrG-kapK y GFP-kapK2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, imp5 e imp4.

- ***ΔpprA***: La región correspondiente al promotor de *pprA* se amplificó con los oligonucleótidos NpprA1 y NpprA2, la región correspondiente al terminador de *pprA* se amplificó con los oligonucleótidos pprA3 y pprA4, y el gen *pyrG*^{Afum} se amplificó con los oligonucleótidos NpprA-pyrG y PprAGFP2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, NpprA1 y pprA4.

- ***ΔabpA***: La región correspondiente al promotor de *abpA* se amplificó con los oligonucleótidos P-abp1 y P-abp2, la región correspondiente al terminador de *abpA* se amplificó con los oligonucleótidos Abp3 y Abp4, y el gen *pyrG*^{Afum} se amplificó con los oligonucleótidos Abp-pyrG y Rfp2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, P-abp1 y Abp4.

- ***ΔslaB***: La región correspondiente al promotor de *slaB* se amplificó con los oligonucleótidos SlaProm1 y SlaProm2, la región correspondiente al terminador de *slaB* se amplificó con los oligonucleótidos Sla-3 y Sla-4, y el gen *pyrG*^{Afum} se amplificó con los oligonucleótidos SlaNuloPyrG y Slagfp2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, SlaProm1 y Sla-4.

4.2 Construcciones utilizadas para la generación de cepas que expresan proteínas fusionadas a GFP o mRFP.

En la figura 7B se muestra un esquema representativo del proceso seguido para generar los diferentes casetes de transformación. El fragmento amplificado codificante para el gen *gfp* y el gen *pyrG* de *A. fumigatus* se inserta entre un fragmento de aproximadamente 1,5 kb correspondiente a la región 3' codificante del gen (eliminando el codon stop) y la región 3' no codificante del mismo tamaño (terminador). En todos los casos cada fragmento de DNA fue amplificado por separado y fusionados como se indica a continuación. Las construcciones se transformaron en la cepa MAD1425 o MAD782 según se indica en el texto.

- **KapK::GFP**: La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *kapK* se amplificó con los oligonucleótidos kapk-1 y kapk-b, la región correspondiente al terminador de *kapK* se amplificó con los oligonucleótidos kapk-c y

kapk-d, y el fragmento *gfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos GFPkapk1 y GFPkapk2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, kapk-1 y kapk-d.

- **KapB::GFP:** La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *kapB* se amplificó con los oligonucleótidos Bgsp1 y Bgsp2, la región correspondiente al terminador de *kapB* se amplifico con los oligonucleótidos Bgsp3 y Bgsp4, y el fragmento *gfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos BGFP1 y BGFP2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, Bgsp1 y Bgsp4.

- **KapA::mRFP:** La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *kapA* se amplificó con los oligonucleótidos imp1 y imp2, la región correspondiente al terminador de *kapA* se amplifico con los oligonucleótidos imp3 y imp4, y el fragmento *mrfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos imp-GFP1 y imp-GFP2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, Bgsp1 y Bgsp4.

- **Nup42like::mRFP y NplA::mRFP:** La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *nplA* (región denominada nup42like) se amplificó con los oligonucleótidos nplA9 y nplA8. Para poder deleccionar la región denominada ZnCC (ver Parte I, sección 6) se fusionó el fragmento nup42like con un fragmento correspondiente al promotor de *nplA* (obtenido con los oligonucleótidos nplA1 y nplA10). La región correspondiente al terminador de *nplA* se amplificó con los oligonucleótidos nplA5 y nplA6, y el fragmento *mrfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos nplA7 y nplA4. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, nplA1 y nplA6. Al transformar la cepa MAD1425 con el casete resultante existía la posibilidad de que el proceso de recombinación se produjera entre la región promotora, lo que daría lugar a una cepa que expresaba la proteína Nup42like::mRFP, o entre la región codificante de *nplA*, generándose una cepa que expresaba la proteína NplA::mRFP.

- **[ZnCC]::GFP:** La región codificante de *ZnCC* se amplificó con los oligonucleótidos nplA1 y nplA2, la región correspondiente al terminador de *nplA* se amplifico con los oligonucleótidos nplA5 y nplA6, y el fragmento *gfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos nplA3 y nplA4. Para realizar la fusión de los tres

fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, nplA1 y nplA6.

- **NapB::GFP**: La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *napB* se amplificó con los oligonucleótidos napB1 y napB2, la región correspondiente al terminador de *napB* se amplifico con los oligonucleótidos napB3 y napB4, y el fragmento *gfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos napBGFP1 y napBGFP2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, napB1 y napB4.

- **NapB_{ΔNLS}::GFP**: Para delecionar la NLS, la región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *napB* se amplificó con los oligonucleótidos napB1 y napB2Dnls, la región correspondiente al terminador de *napB* se amplifico con los oligonucleótidos napB3 y napB4, y el fragmento *gfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos napBDnlsGFP1 y napBGFP2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, napB1 y napB4.

- **VeA::GFP y VeA1::GFP**: La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *veA* o *veA1* se amplificó con los oligonucleótidos VeAGSP1 y VeAGSP2, la región correspondiente al terminador de *veA* se amplifico con los oligonucleótidos VeAGSP3 y VeAGSP4, y el fragmento *gfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos VeAGFP1 y VeAGFP2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, Bgsp1 y Bgsp4.

- **AbpA::GFP y AbpA::mRFP**: La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *abpA* se amplificó con los oligonucleótidos Abp1 y Abp2, la región correspondiente al terminador de *abpA* se amplifico con los oligonucleótidos Abp3 y Abp4, y el fragmento *gfp::pyrG^{Afum}* o *mrfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos Rfp1 y Rfp2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, Abp1 y Abp4.

- **SlaB::GFP**: La región correspondiente al extremo 3' de la región codificante de *slaB* se amplificó con los oligonucleótidos sla-1 y sla-2, la región correspondiente al terminador de *slaB* se amplifico con los oligonucleótidos sla-3 y sla-4, y el fragmento *gfp::pyrG^{Afum}* se amplificó con los oligonucleótidos slagfp1 y slagfp2. Para realizar la

fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos de los extremos, sla-1 y sla-4.

4.3 Otras construcciones generadas mediante PCR de fusión.

Para generar la cepa que expresa la versión de NplA etiquetada con los epítomos Myc₃ y (HA)₃ (Myc₃-NplA-HA₃) en cada uno de sus extremos se construyó un casete formado por el promotor de *nplA*, la región codificante de *nplA*, el epítipo (HA)₃ y el terminador de *nplA*. El fragmento correspondiente al promotor y la región codificante de *nplA* se amplificó con los oligonucleótidos nplA1 y nplA8. La región correspondiente al terminador de *nplA* se amplificó con los oligonucleótidos HANplA1 y nplA6 y el fragmento que codifica para el epítipo (HA)₃ se amplificó con los oligonucleótidos nplA7 y HANplA2. Para realizar la fusión de los tres fragmentos se añadieron a la mezcla de reacción los oligonucleótidos nplA1 y nplA6. El casete obtenido se introdujo en pGEM T-Easy para poder escindirlo como un fragmento *NotI/NotI* e introducirlo en el sitio *NotI* de pBlueScript-SK+. Una vez generado este plásmido se realizó la mutagénesis dirigida, utilizando los oligonucleótidos NplA-Nco1 y NplA-Nco2, para generar un sitio de corte para *NcoI* entre el promotor y la región codificante de *nplA*. En este sitio *NcoI* se introdujo el DNA codificante del epítipo Myc₃.

5. TÉCNICAS DE *Aspergillus nidulans*.

5.1 Transformación de *A. nidulans*.

La transformación se realizó siguiendo el protocolo descrito por Tilburn et al.⁶⁸. Se inocularon 2x10⁶ conidiosporas en 400ml de medio mínimo que contenían como fuente de nitrógeno tartrato amónico 5mM y D-glucosa al 1% (p/v) como principal fuente de carbono, añadiendo los requerimientos apropiados para cada cepa. El cultivo se incubó durante 16-18 h a 30°C y el micelio se recolectó por filtración y se lavó con agua destilada estéril. Se resuspendió 1g de micelio en 20ml de Tampón de protoplastos (MgSO₄ 1,2M, NaH₂PO₄ 10mM, pH 5,8), frío y estéril. El tratamiento para destruir la pared celular se realizó con la mezcla de enzimas Glucanex (Novo Nordisk. Ref. CH-4243). Se utilizaron 150mg de Glucanex por cada gramo de micelio y la mezcla de digestión se preincubó durante 5 minutos a 0°C, pasados los cuales se incubó a 30°C con agitación suave durante 1 a 2 h, comprobándose entonces la formación de protoplastos al microscopio. Una vez formados los protoplastos, se depositó la suspensión en dos

tubos estériles de 50ml y se cubrió, sin mezclar, con un volumen igual de la solución Colchón de flotación (D-Sorbitol 0,6M, Tris-HCl 0,1M, pH 7,5) frío y estéril. Los tubos con la solución bifásica se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos a 4000 r.c.f. en el rotor A-4-44 (Eppendorf 5810R). Los protoplastos, que forman una banda en la interfase, se recogieron con una pipeta Pasteur estéril y se diluyeron con 2 volúmenes de Solución ST (D-Sorbitol 1M, Tris-HCl 10mM, pH 7,5), centrifugando posteriormente a 2800r.c.f. durante 10 minutos a 4°C en el rotor A-4-44. Se eliminó el sobrenadante por decantación y se lavó el sedimento de protoplastos con 1ml de Solución ST, resuspendiéndolos y centrifugándolos a 5.000r.p.m., repitiendo este proceso tres veces. Después de estos lavados, se determinó la concentración de protoplastos ajustándola a 5×10^8 protoplastos/l mediante concentración o dilución con Solución STC (D-Sorbitol 1M, Tris-HCl 10mM, CaCl₂ 10mM, pH 7,5). En un tubo de 50ml estéril se mezclaron cuidadosamente 200 µl de esta suspensión con el DNA transformante (1 a 3 µg DNA), y a continuación se adicionaron 50µl de una solución de polietilenglicol (PEG 6000 60% (p/v), Tris-HCl 10mM, CaCl₂ 10mM, pH 7,5). La mezcla de transformación se incubó 20 minutos en hielo y a continuación se añadió 1 ml de solución de polietilenglicol mezclando enérgicamente e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos adicionales. Finalmente se añadieron 5ml de Solución STC a cada tubo, se mezcló suavemente y se añadieron 15ml de “Top agar” (sacarosa 1M, agar 0.25% (p/v)) fundido y atemperado a 48°C a cada tubo, mezclándose las dos soluciones mediante inversión y repartiendo 5 ml de la mezcla por la superficie de cada placa de medio de regeneración (MMA, sacarosa 1M, glucosa 1% (p/v), tartrato amónico 5mM, agar 1% (p/v)) con los requerimientos adecuados.

5.2 Técnica de “pop-out”.

En *A. nidulans* se puede utilizar la misma técnica que en *S. cerevisiae* para generar reemplazamientos génicos basados en la eliminación del marcador de selección URA3. Se utiliza el compuesto tóxico 5-fluoro-orótico (5-FOA) para forzar la selección de eventos de recombinación mitótica entre los fragmentos del gen diana que flanquean el gen HIS3 que codifica para la orotidina 5’fosfato carboxilasa, *pyrG* en *A. nidulans*. En este hongo se puede utilizar el gen *pyrG* de *A. fumigatus* o el gen *pyr-4* de *N. crassa* para complementar la mutación de pérdida de función *pyrG89*. Para seleccionar las cepas que han perdido estos marcadores se sembró una suspensión de conidiosporas de la cepa de interés sobre una placa de MMA con 1% de glucosa como fuente de carbono,

5mM tartrato-amonio como fuente de nitrógeno, 10nM de uridina, 1mg/ml de 5-FOA y los requerimientos de la cepa. Las colonias que se obtuvieron se sembraron por agotamiento en otra placa similar pero sin 5-FOA para obtener colonias aisladas las cuales fueron posteriormente analizadas por siembra en MMA con o sin pirimidinas. Aquellas estirpes que no podían crecer en la placa sin uridina y uracilo se analizaron por Southern-blot para determinar la pérdida por recombinación del marcador de selección. Esta técnica se empleó para la construcción del alelo *kapK2* o del alelo *kapA31*.

5.3 Extracción de proteínas totales de *A. nidulans*.

Los extractos proteicos totales de las distintas cepas de *A. nidulans* se obtuvieron a partir de 200-250mg de micelio filtrado con Miracloth (Calbiochen 475855), congelado en nieve carbónica y liofilizado durante 18h en un liofilizador Cryodos (Telstar). El micelio liofilizado, depositado en un tubo de tapón de rosca de 2ml se trituró con una bola de cerámica de 0,55cm utilizando un molino FP120 Fast Prep Cell Disruptor de BIO101/Savant con un pulso de 10 segundos a fuerza 4,0. A continuación se añadió 1 ml de tampón de extracción (ver mas abajo), se resuspendió el polvo de micelio y se incubó durante 1,5 horas a 4°C con agitación por inversión utilizando una rueda giratoria. Las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 14.000g y 4°C, se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford⁶⁹. Los extractos proteicos se guardaron a -80°C hasta su utilización.

El tampón de extracción utilizado en la mayoría de los casos fue el “A50” salvo cuando se trataron muestras procedentes de las cepas MAD1399, MAD1420 y MAD1794 que expresan AbpA::mRFP, AbpA::GFP y SlaB::GFP, respectivamente, con las que se utilizó “Buffer-NP40”. La composición de cada uno de los tampones se indica a continuación:

- A50: Hepes 25mM pH 7,5, KCl 50mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 0,1mM, glicerol 10%, 0,5mM Ditioneitol (DTT), 1μM pepstatina, 0,6μM leupeptina, 1mM Pefablock.

- Buffer-NP40: 1mM EDTA, 20mM KCl, 0,1% NP-40, 0,5mM DTT, 1 pastilla de inhibidores de proteasas de Roche por 50ml de tampón.

Para los ensayos de “Western-blot” se precipitaron 50μg de proteína con ácido tricloroacético, concentración final 10% (v/v), y se lavaron con una mezcla Etanol/Eter 1:1 y 1:3 sucesivamente. Una vez precipitadas se resuspendieron en Tampón de Ruptura (62,5mM Tris-HCl, pH6,8; 2% (p/v) dodecil sulfato sódico (SDS); 5% (v/v) β-

mercaptoetanol; 6M urea; 0,05% (p/v) azul de bromofenol) y se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C durante 5 minutos.

6. TÉCNICAS UTILIZADAS EN *Saccharomyces cerevisiae*.

El método empleado para la transformación de *S. cerevisiae* es el mismo que el protocolo de transformación utilizado por Yang et al.⁷⁰.

La detección de la activación de la expresión del gen de la β -galactosidasa se realizó mediante tinción de los transformantes con X-Gal. Para ello se crecieron los transformantes en una placa de medio selectivo y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Whatman Ref. 10 401 116). Esta membrana se incubó a -80°C para favorecer la rotura de las células y posteriormente se incubó a 30°C sobre un trozo de papel Whatman empapado con la mezcla de revelado (X-Gal (100mg/ml en DMSF), Z-buffer y β -mercaptoetanol.)

7. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR, BIOQUÍMICA Y PROTEÓMICA.

7.1 Ensayos de inmunodetección de proteínas, “Western Blot”.

Las muestras precipitadas se resuspendieron en 20 μ l de Tampón de Ruptura (ver sección 5.3) y se desnaturalizaron hirviéndolas a 100°C durante 5 minutos. La separación electroforética se realizó en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida⁷¹. El protocolo de “Western Blot” utilizado fue el descrito por Orejas y colaboradores⁶³. Las proteínas etiquetadas se detectaron, según el caso, con un anticuerpo monoclonal de ratón α -cMyc (9E10, Santa Cruz Biotechnology) o con un anticuerpo monoclonal de rata α -HA (3F10, Roche) diluidos 1:1.000. Los anticuerpos secundarios conjugados a la peroxidasa de rábano usados fueron, según el caso, un anticuerpo de cabra contra inmunoglobulina IgG de ratón (H & L) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) o contra inmunoglobulinas de rata (3010-05, Southern Biotech), ambos utilizados en dilución 1:4.000. La actividad peroxidasa se detectó utilizando el sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham). Las imágenes se obtuvieron mediante un Analizador de Imágenes de Quimioluminiscencia (TDI, 06-LAS3000Q) y se analizaron con el programa Multi Gauge de Fujifilm.

7.2 Síntesis y aislamiento de cDNA de *A. nidulans*.

La síntesis de DNA codificante se realizó con el “kit” AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit de Invitrogen. La primera hebra se obtuvo usando como molde para la reacción 0,5µg de una extracción de RNA total de una cepa silvestre y el oligonucleótido Oligo-(dT) del kit en las condiciones indicadas por el fabricante. La amplificación del cDNA específico para cada gen se realizó mediante PCR con oligonucleótidos adecuados (Tabla 2), utilizando como molde 2µl de la reacción de síntesis de cDNA y la polimerasa Pfu DNA Polymerase de Promega. Las condiciones de PCR fueron las indicadas por el fabricante de la polimerasa, con ligeras variaciones en función de los oligonucleótidos empleados y el tamaño del cDNA a amplificar.

7.3 Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*.

La expresión de proteínas de fusión se llevó a cabo en la cepa DH1 de *E. coli* transformada con el plásmido de expresión adecuado (variantes de pGEX-2T y pQE80zz). Se creció la bacteria en 10 ml de medio LB con 100µg/ml de ampicilina a 37°C durante 16 horas. Se diluyó el cultivo 1/40 en un volumen final de 50ml de LB más ampicilina y se incubó en agitación a 30°C hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600nm de 0,5 unidades. En ese momento se añadió IPTG hasta una concentración de 0,1mM y se incubó durante 2h adicionales con agitación a 30°C.

Los cultivos se centrifugaron a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en 15 ml de BB50 (50mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 7,5, 2mM MgCl₂) al que se había añadido el cocktail de inhibidores de proteasas Complete (Roche Diagnostics) en la cantidad recomendada por el fabricante. Las células fueron lisadas utilizando una French Press y se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C en una centrífuga Eppendorf 5402. De cada muestra se recogió el sobrenadante y se visualizaron las proteínas solubles en geles desnaturalizantes de poliacrilamida que fueron teñidos con Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad).

7.4 Cromatografía de afinidad.

Previamente a su utilización la matriz de IgG sefarosa (Amersham Biosciences) fue lavada con una solución de glicina 0,2M pH 2.2 para eliminar posibles proteínas contaminantes. A continuación se lavó repetidas veces con 1 volumen de PBS hasta que el pH de la resina quedó equilibrado al del PBS, quedando así lista para su utilización.

La resina que no se utilizó inmediatamente se almacenó con un volumen de etanol 20% en PBS a 4°C. La matriz de Glutathion sefarosa (Amersham) se preparó según las indicaciones del fabricante.

En los experimentos de interacción utilizando ZZ::KapA⁵⁰ o ZZ, la matriz de IgG sefarosa fue cargada incubando 20µl de matriz con 300µg de extracto de proteínas de *E. coli* en el que se había expresado ZZ::KapA⁵⁰ o ZZ, en un volumen final de 1.5ml del tampón HNA (50mM Hepes/KOH pH 7,5, 200mM NaCl, 5mM acetato magnésico e inhibidores de proteasas de Roche). La matriz de IgG sefarosa cargada con ZZ o ZZ::KapA⁵⁰ se lavó tres veces con 700µl de HNA quedando lista para su utilización en experimentos de “pull-down” utilizando como presa los extractos proteicos crudos de *Aspergillus*. Para evitar la unión inespecífica de proteínas de *A. nidulans* a la matriz, el extracto de proteínas totales de *A. nidulans* (4mg) se incubó con 250µl de matriz de IgG sefarosa sin cargar durante 4h a 4°C. El extracto de proteínas de *Aspergillus* tratado se recuperó reteniendo la resina y las proteínas unidas en columnas de cromatografía (Micro Bio-spin, Bio-Rad) y se incubó con 25µl de matriz cargada con ZZ::KapA⁵⁰ o ZZ, durante 4h a 4°C. Transcurrido este tiempo las muestras se depositaron en otro soporte o columna del mismo tipo y se lavaron seis veces con 700µl del tampón HNA. Las proteínas de *Aspergillus* que se habían unido a ZZ::KapA⁵⁰ fueron eluidas con 1,5M MgCl y precipitadas durante 40 minutos a -20°C utilizando un volumen de la solución: TCA al 10% (v/v) diluido en acetona y 20mM DTT. Las proteínas precipitadas se recogieron por centrifugación durante 10 minutos a 14.000 rpm y se lavaron tres veces con 800µl de una solución de acetona y 20mM DTT. El precipitado de proteínas obtenido se secó al vacío y se guardó a -80°C hasta su utilización.

Para analizar la interacción de KapA⁵⁰ con proteínas expresadas *in vitro* o con proteínas expresadas en *E. coli* como fusiones a GST se cargó la matriz de IgG sefarosa con KapA⁵⁰ o ZZ en tampón HNA como se ha indicado anteriormente, a continuación se añadió la proteína expresada *in vitro* o el extracto de *E. coli* correspondiente. Las muestras se incubaron mezclándose por inversión utilizando una rueda giratoria durante 1,5 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo se lavó la matriz seis veces con 1ml de HNA, resuspendiendo la matriz con una ligera agitación y concentrándola por centrifugación a 5000g en cada lavado. En el quinto lavado cada muestra se transfirió a un tubo nuevo para eliminar los posibles restos de proteínas que hubieran podido quedar adheridos a la pared del tubo. Tras el último lavado se retiró completamente el sobrenadante y se

resuspendió la matriz en 12µl de tampón de ruptura. Las proteínas se desnaturalizaron 5 minutos a 100°C y se cargaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida para ser analizadas. Las proteínas presentes en el gel se visualizaron mediante tinción con Bio-Safe Coomassie (Bio-Rad).

Cuando se utilizaron extractos de proteínas expresadas en *E. coli* como fusiones a GST en lugar de ZZ::KapA⁵⁰ el procedimiento seguido fue similar pero en lugar de utilizar una matriz de IgG sefarosa se utilizó una matriz de Glutathion sefarosa.

7.5 Identificación de proteínas de *A. nidulans* por espectrometría de masas.

La identificación de las proteínas capaces de interactuar con ZZ::KapA⁵⁰ fue llevada a cabo en colaboración con la Doctora Vivian de los Ríos.

Siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior se obtuvieron posibles interactores de la Importina α , los cuales fueron resueltos en geles desnaturalizantes de SDS y poliacrilamida. Los geles se tiñeron con el kit PlusOne™ Silver Staining kit Protein (Amersham Biosciences) y las bandas de interés se escindieron del gel con un escalpelo. Estas bandas aisladas se procesaron utilizando un digestor automático Investigator ProGest (Genomic Solutions). El protocolo de digestión, descrito por Shevchenko y col.⁷², consistió en la incubación de las bandas en 50mM NH₄HCO₃ durante 20 minutos, seguido de una incubación de 10 minutos con AcN (acetonitrilo) para deshidratar el fragmento de gel. La temperatura del digestor se elevó hasta 56°C y las proteínas se redujeron con DTT 10mM + NH₄HCO₃ 25mM durante 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se apagaron los calentadores y las muestras se incubaron en la solución reductora durante otros 20 minutos. A continuación las muestras fueron alquiladas por incubación en iodoacetamida 100mM + NH₄HCO₃ 50mM y lavadas 10 minutos en 50mM NH₄HCO₃. Las muestras volvieron a ser deshidratadas con AcN, durante 15 minutos, y se les añadió 16ng/µl de tripsina porcina modificada con grado de pureza de secuenciación (Promega) preparada en una solución de 25mM NH₄HCO₃, siendo incubadas a 37°C durante 6 horas. Las bandas fueron posteriormente lavadas con 50mM NH₄HCO₃ y los péptidos fueron extraídos utilizando, secuencialmente, NH₄HCO₃ 25mM durante 15 minutos, TFA (ácido trifluoroacético) 0,1% (p/v) en agua durante 15 minutos y, finalmente, AcN durante otros 15 minutos, hasta un volumen final de 100µl. Los péptidos extraídos se secaron en un sistema SpeedVac y se resuspendieron en 10µl de solución TA (AcN 33% (v/v) en agua, TFA 0,1%). Una

alícuota de 0,3µl de cada muestra se depositó manualmente en un soporte AnchorChip MALDI (Broker Daltonic) de 400µm de diámetro y se dejó secar a temperatura ambiente. Tras secarse, se les añadió 0,3µl de solución matriz (una solución saturada a 1µg/µl de ácido 2,5- dihidroxibenzoico en solución TA) y se dejó secar a temperatura ambiente.

Las muestras fueron analizadas automáticamente utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker Reflex™ IV (Bruker-Franzen Analytic GmbH) equipado con la fuente SCOUT™ en el modo reflector de iones positivos y utilizando la extracción retardada. El voltaje de aceleración de iones fue 20kV. La calibración externa se realizó con una mezcla de péptidos sintéticos y cada espectro se calibró internamente con señales procedentes de autoproteólisis de tripsina. Los valores de las masas de los péptidos tripticos se transfirieron mediante el programa MS Bio Tool™ (Bruker) y se utilizaron para compararlos frente a la base de datos de proteínas de *Aspergillus nidulans* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>) con el programa Mascot™ (Matrix Science).

8. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.

La mayoría de las muestras se observaron utilizando un microscopio vertical de epifluorescencia Eclipse E-600 de Nikon, equipado con un objetivo de 60 aumentos Plan Apo 1.4 N.A., un objetivo de 100 aumentos Plan Apo. 1.4 N.A., una lámpara de mercurio de 100w y filtros B2-A, G2-A y UV-2A para la detección de la fluorescencia emitida por GFP, RFP y DAPI, respectivamente. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital ORCA-ER (Hamamatsu Photonics) y los programas de obtención y tratamiento de imágenes Wasabi (Hamamatsu Photonics) y Metamorph (Universal Image).

Para la observación *in vivo* y la obtención de las películas se utilizó un microscopio invertido LEICA DMI6000B equipado con un incubador (Tempcontrol 37-2 digital, PECON) que permitía mantener las muestras a 37°C. Las imágenes confocales de Abp::GFP fueron obtenidas con el microscopio LEICA TCS-SP2-AOBS-UV con un láser de 488nm. Las imágenes confocales de la inmunodetección de actina fueron adquiridas con un microscopio Zeis LSM510 equipado con un láser HeNe de 543nm y analizadas con el programa Zeis LSM.

8.1 Observación al microscopio de *A. nidulans*.

En cada observación se inocularon 10µl de la solución de conidioesporas sobre la superficie de un cubre-objetos de vidrio redondo de 14mm de diámetro o cuadrado de 20x20mm (Menzel-Glaser), sumergido en 3ml de “watch minimal medium”, WMM⁷³, con glucosa 1% (p/v), tartrato amónico 5mM y los requerimientos necesarios. Los cubreobjetos se colocaron en placas de 12 ó 6 pocillos (Falcon) y se incubaron a temperatura ambiente (25°C), 30, 37 ó 42°C, de 6 a 48 horas, según el experimento. El hongo creció sobre la superficie del cubreobjetos y se procedió a la observación directa de cada muestra. Para la observación en el microscopio invertido se inoculó la solución de conidiosporas en placas de 22mm (Willco-Dish) con fondo de cristal. Se incubaron como se ha descrito anteriormente y se observaron directamente al microscopio.

También se emplearon otras técnicas de microscopía:

- Muestras fijadas: la **fijación** de las células crecidas sobre los cubreobjetos, se realizó utilizando una solución fresca de PBS + paraformaldehído al 4% (p/v), a 4°C durante 16-18 horas. Tras la fijación, las muestras se lavaron 5 veces con 1 ml de PBS y 2 veces con agua destilada.

- Tinción con **DAPI**: para observar la posición de los núcleos se añadió a las muestras fijadas una mezcla de tinción que contenía glicerol al 50% (v/v) y 0,07µg/ml del colorante DAPI. El montaje se realizó con glicerol al 50% (v/v) y sellando los cubres con esmalte de uñas.

- Tratamiento con drogas: el tratamiento con **Latrunculina B** (Calbiochen, Ref. 428020) se realizó añadiendo al medio LatB a una concentración final de 100µM y observando las muestras tras 10-15 minutos de incubación. El tratamiento con **benomilo** (Sigma-Aldrich, Ref. 38-1586) se realizó añadiendo al medio 3µg/ml e incubándolas durante 20 minutos. El tratamiento para bloquear procesos celulares dependientes de energía se realizó añadiendo al medio una mezcla de **azida** y **NaF** a una concentración de 15mM en ambos casos.

- **Inmunolocalización**: la inmunodetección de actina se realizó siguiendo el protocolo descrito por Prigozhina et al.⁷⁴, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-actina C4 (ICN Biomedicals Inc.) a una dilución 1:500 como anticuerpo primario, y un anticuerpo secundario contra IgG de ratón acoplado al fluorocromo Alexa 568 (Molecular Probes) a una dilución 1:1.000.

- Tinción con **MitoTracker**: para observar las mitocondrias se añadió al medio de cultivo el colorante MitoTracker a una concentración final de 0,2nM en el momento de la inoculación de las esporas. Tras 16-18h de cultivo se procedió a la observación de las muestras.

- Para la observación de proteínas expresadas bajo el control del **promotor alca** las muestras fueron incubadas en medio mínimo con glucosa 0,01% (p/v) durante 16 horas y posteriormente éste medio fue sustituido por medio fresco conteniendo etanol al 1% (v/v) como fuente de carbono. Tras 1 hora de incubación se procedió a observar las muestras en el microscopio.

8.2 Observación al microscopio de *S. cerevisiae*.

Se creció la cepa en medio SD líquido con los requerimientos adecuados, menos el de selección del plásmido, hasta que alcanzó una D.O. a 600nm de entre 0,8 y 1,2 unidades. Se recogió 1ml de cultivo y se centrifugó a 13.000r.p.m. durante 30 segundos. Se retiró el sobrenadante dejando unos 20µl de medio en los que se resuspendieron de nuevo las células. La observación directa al microscopio se realizó utilizando 2µl de la suspensión de levaduras bajo el cubreobjetos.

9. “KITS” DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA UTILIZADOS.

Los diferentes “kits” se utilizaron siguiendo en todo momento las instrucciones de los respectivos fabricantes.

FastDNA® Kit BIO101® Systems (Q-BIOgene): se utilizó para la extracción de DNA genómico tanto de *A. nidulans* como de *S. cerevisiae*.

QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen): se utilizó para la purificación de productos de PCR.

QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen): se utilizó para la purificación de fragmentos de DNA procedentes de electroforesis en geles de agarosa.

QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen): se utilizó para la purificación de plásmidos procedentes de *E. coli* con alto grado de pureza y concentración.

High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche): se utilizó para la purificación rutinaria de plásmidos procedentes de *E. coli*.

TOPO TA Cloning® Versión P (Invitrogen): Se utilizó para la clonación rápida de productos de PCR en el vector pCR2.1-TOPO mediante ligación por topoisomerasas.

pGEM T-Easy Vector System (Promega): Se utilizó para la clonación rápida de productos de PCR en el vector pGEM T-Easy.

Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen): se utilizó para sintetizar cDNA monohebra a partir de RNA total de *A. nidulans*.

TNT Coupled Transcription-Translation System (Promega): se utilizó para la síntesis *in vitro* de proteínas y su marcaje con metionina [³⁵S] (1,000 Ci/mmol).

Rediprimer™ II Random Prime Labelling System (Amersham Biosciences): se utilizó para el marcaje de fragmentos de DNA con dCTP [³²P] que fueron posteriormente utilizados como sondas en ensayos de Southern-Blot.

ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (Amersham Biosciences): se utilizó para la limpieza de las sondas marcadas radiactivamente con el kit anterior.

PlusOne™ Silver Staining kit Protein (Amersham Biosciences): se utilizó para la tinción de geles de poliacrilamida y la visualización de proteínas en estos geles.

ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences): se utilizó para la detección de anticuerpos conjugados a la peroxidasa de rábano en ensayos de Western Blot.

Estudio de la ruta general de exportación nuclear en *Aspergillus nidulans*

PARTE I

INTRODUCCIÓN.

Los primeros estudios de los sistemas de exportación nuclear se realizaron microinyectando proteínas expresadas *in vitro* en oocitos de *Xenopus* con los que se consiguieron identificar varias proteínas que eran excluidas o exportadas del núcleo ⁷⁵. Actualmente, la ruta de exportación nuclear mediada por la carioferina CRM1/Exportina-1 es una de las mejor conocidas. En *Schizosaccharomyces pombe* se identificó por primera vez el gen que codifica para la Exportina-1 y fue denominado CRM1, dado que mutaciones en este gen producían alteraciones en la estructura de los cromosomas ("Chromosome Region Maintenance") ⁷⁶. Posteriormente, una vez que se determinó el papel de la proteína CRM1 en las rutas de transporte nuclear, como uno de los principales exportadores de proteínas y RNAs, se propuso que este gen fuera designado como *XPO1* (por *Exportin* 1) ⁷⁷. Además de su papel en la exportación nuclear, CRM1/XPO1 parece coordinar procesos reguladores y estructurales durante la mitosis ⁷⁸.

CRM1/Exportina-1 pertenece a la superfamilia de proteínas importina β , caracterizada por la presencia de un dominio común denominado CRIME (por *CRM1*, *IM*portin β , *E*tcétera.) ⁷⁹. Los resultados obtenidos mediante cristalografía de rayos X, microscopía electrónica y modelado por homología ²² han permitido elaborar un modelo estructural de la proteína completa. Según el modelo propuesto, la Exportina-1, tanto en humanos como en hongos, contendría en su secuencia de aminoácidos 19 repeticiones HEAT, un motivo que está presente en todos los miembros de la familia importina β . Cada repetición HEAT está compuesta por aproximadamente 50 aminoácidos, formando dos hélices α dispuestas antiparalelamente, denominadas A y B, y que están conectadas por un pequeño lazo ⁸⁰. El conjunto de estas repeticiones forma una superestructura helicoidal donde las hélices A se disponen hacia el exterior y las hélices B hacia el interior de la molécula. En la región amino-terminal se localiza el dominio CRIME involucrado en la interacción con RanGTP y que se precisa para la formación del complejo exportador ⁸¹. La secuencia de aminoácidos en la región central de la Exportina-1 está ampliamente conservada y en ella se localizan los residuos implicados en el reconocimiento e interacción directa con la carga que, como se ha indicado, ocurre de forma dependiente de la interacción previa de RanGTP con la región CRIME. La disposición de los diferentes motivos funcionales de la Exportina-1, expuestos anteriormente, se detalla en el panel A de la figura I.1.

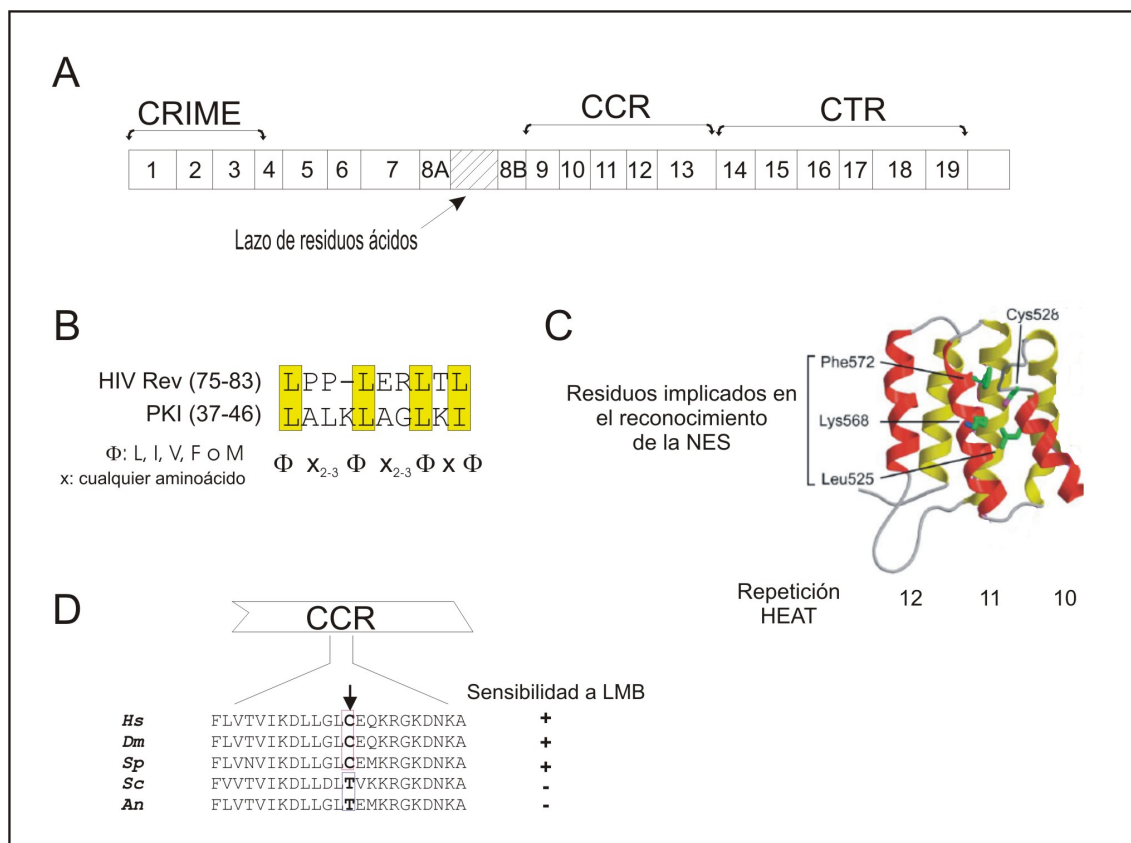


Figura I.1: Dominios funcionales presentes en CRM1/Exportina-1. **A)** Estructura esquematizada de CRM1 en la que se indican cada una de las repeticiones HEAT. En la región N-terminal se localiza el dominio CRIME por donde se produce la interacción con RanGTP. En la repetición HEAT 8 se localiza el lazo de residuos ácidos que impediría la unión del sustrato en ausencia de Ran. **B)** Alineamiento de las señales de localización nuclear (NES) identificadas en la proteína Rev del virus HIV-1 (HIV Rev) y en el inhibidor de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKI); en la parte inferior se detalla el consenso establecido para las NESs reconocidas por los homólogos de la proteína CRM1. **C)** Detalle de la estructura 3D de la región central de CRM1 donde se localizan los residuos implicados en el reconocimiento de la NES y el residuo de cisteína con el que interacciona la LMB dentro de las hélices α de la repetición HEAT 11. **D)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región CCR de Exportinas-1 de diferentes organismos en la que se localiza el residuo de cisteína donde se une covalentemente la LMB. Aquellos organismos que en la posición de la cisteína tiene una treonina son insensibles a la droga (indicado con un símbolo -). Las abreviaturas de los organismos corresponden con: Hs *Homo sapiens*, Nc *Neurospora crassa*, Sc *Saccharomyces cerevisiae*, Sp *Schizosaccharomyces pombe*, Dm *Drosophila melanogaster* y An *Aspergillus nidulans*. LMB, Leptomicina B.

La Exportina-1 reconoce en sus cargas las señales de exportación nuclear (NES), las cuáles consisten en una corta secuencia de aminoácidos hidrofóbicos regularmente espaciados que se ajustan al consenso: Φ - X_{2-3} - Φ - X_{2-3} - Φ - X - Φ , siendo X cualquier aminoácido y Φ un residuo de leucina, isoleucina, valina, fenilalanina o metionina (Fig. I.1B), aunque la leucina es el más frecuente. Las primeras NESs fueron caracterizadas en el inhibidor de la proteína quinasa dependiente de cAMP⁸² y en la proteína REV del virus de la inmunodeficiencia tipo 1 (HIV-1)⁷⁹. Diferentes mecanismos pueden

modificar positiva o negativamente la interacción de la Exportina-1 con proteínas que contienen una NES. Así por ejemplo, la fosforilación de la NES se requiere para la exportación nuclear de la ciclina D1 de humanos ⁸³, y tiene el efecto contrario en el transporte de c-Fos por CRM1/Exportina-1 ⁸⁴. La unión exportina-carga no sólo requiere de la presencia de una NES en la carga, sino que además precisa de la interacción de la exportina con la GTPasa Ran. Como ocurre en todas las exportinas caracterizadas, la unión de RanGTP a la carioferina incrementa la afinidad por el sustrato que tiene que ser exportado del núcleo. Sin embargo, en determinados casos el complejo CRM1/RanGTP/Carga necesita ser estabilizado con elementos adicionales del sistema de transporte, como el cofactor RanBP3, un miembro nuclear de la familia de proteínas que se unen a Ran ^{85,86}.

El paso de los complejos de transporte CRM1/RanGTP/Carga a través del complejo del poro nuclear (NPC) implica la interacción específica de la exportina con aquellas nucleoporinas ricas en repeticiones de residuos fenilalanina-glicina (FG). La distribución no aleatoria de nucleoporinas FG desde la periferia hasta el interior del NPC apoya la hipótesis de que ciclos continuos de asociación y disociación entre los complejos de transporte y las nucleoporinas podían permitir el paso del complejo a través del NPC ⁸⁷ (ver Introducción General). La dirección del transporte queda determinada por i) el gradiente de RanGTP/GDP y ii) la presencia de un gradiente de afinidad de interacción entre la exportina y las nucleoporinas de forma creciente a su disposición más citoplásmica dentro del NPC ⁴⁵.

La ruta de exportación nuclear mediada por CRM1/Exportina-1 es inhibida específicamente por el fungicida leptomicina B (LMB). Este compuesto (un ácido graso insaturado con un anillo terminal de δ -lactona) se une covalentemente a un residuo de cisteína localizado en la región central de CRM1/Exportina-1 (Fig. I.1C). La situación de este residuo de cisteína es contigua a los residuos implicados en el reconocimiento y unión a la NES, por lo que la unión de la LMB impide el acceso de la NES a su sitio de unión ⁸⁸. La resistencia de *Saccharomyces cerevisiae* a la LMB reside en la presencia de un residuo de treonina en lugar del de cisteína que es modificado por la LMB en la CCR (Fig. I.1D) ⁸⁹. La sustitución de este residuo de treonina por cisteína (T539C) da lugar a que *S. cerevisiae* se sensibilice a esta droga ⁹⁰. *Aspergillus nidulans*, al igual que *S. cerevisiae*, es insensible a LMB lo que ha impedido estudiar esta ruta de exportación nuclear en este organismo modelo. La alta conservación en la secuencia de aminoácidos entre los miembros de la familia Crm1p/Exportina-1 ²⁹ fue la base para proponer que la

resistencia a LMB de *A. nidulans* también depende de la ausencia de un residuo de cisteína en el sitio de unión de la LMB en el ortólogo de Crm1p/Exportina-1⁸⁹.

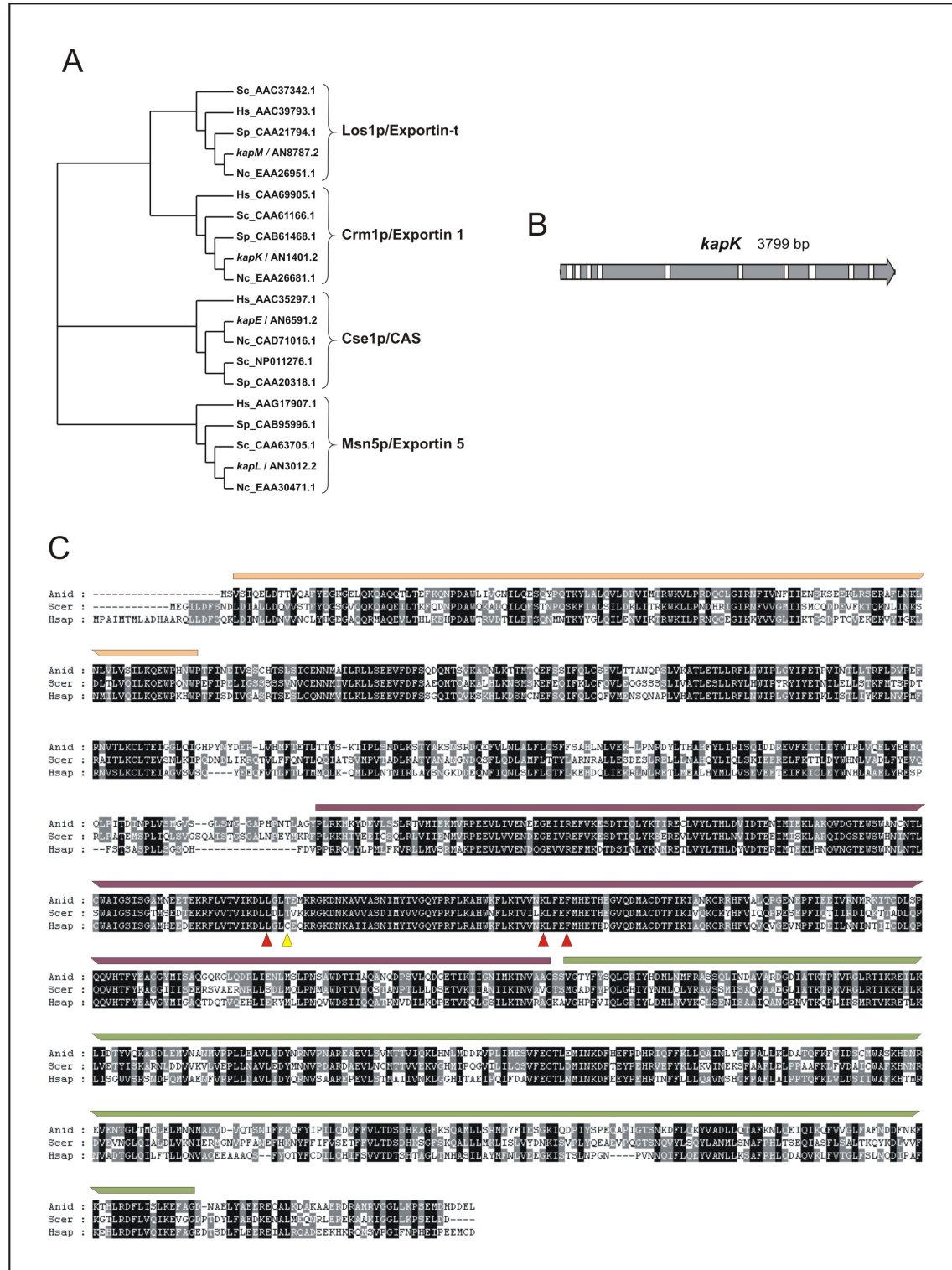


Figura I.2: Caracterización del locus *kapK/ANI401*. **A)** Dendrograma que representa los diferentes exportadores encontrados en el genoma de *A. nidulans* y su comparación con los de otros hongos y eucariotas superiores para determinar sus posibles homólogos. Los códigos de las entradas EMBL se muestran al final de cada rama. **B)** Representación esquemática de la región codificante de *kapK*. Los bloques en blanco representan la posición de los 10 intrones presentes en la región genómica. **C)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de KapK de *A. nidulans* (Anid), Crm1p de *S. cerevisiae* (Scer) y la Exportina-1 de *H. sapiens* (Hsap). En naranja se señala la longitud de la región CRIME, en morado la extensión de la región CCR y en verde la región carboxilo-terminal. Las puntas de flecha rojas señalan los residuos implicados en el reconocimiento de la NES y la punta de flecha amarilla la posición del residuo de cisteína o treonina crítico para la unión de la LMB. Las abreviaturas de los organismos corresponden con: Hs *Homo sapiens*, Nc *Neurospora crassa*, Sc *Saccharomyces cerevisiae*, Sp *Schizosaccharomyces pombe*, Dm *Drosophila melanogaster* y An *Aspergillus nidulans*.

En este trabajo se ha identificado el homólogo de Crm1p/Exportina-1 en *A. nidulans*, KapK, y se ha generado una versión mutante sensible a la LMB, demostrando que la hipótesis anterior es cierta. Se ha identificado un factor transcripcional, NirA, cuya exportación nuclear es llevada a cabo por KapK y se ha identificado un tercer elemento implicado en esta ruta de exportación, la nucleoporina NplA. El análisis de estos elementos de la ruta de exportación y sus cargas han permitido estudiar por primera vez cómo puede producirse la exportación nuclear en el organismo modelo *A. nidulans*.

RESULTADOS.

1. Identificación del homólogo de la Exportina-1 en *Aspergillus nidulans*.

Utilizando la secuencia de aminoácidos de Crm1p de *Saccharomyces cerevisiae* y de la Exportina-1 de humanos se realizaron búsquedas del tipo Blastp en la base de datos de ORFs (“Open Reading Frames”) del genoma de *A. nidulans*. Se encontró una única proteína con un alto nivel de similitud en su secuencia de aminoácidos a las utilizadas en las búsquedas, la proteína codificada por el locus *ANI401.3* y que se ha denominado KapK. Adicionalmente, para verificar que se había encontrado el mejor candidato para la Exportina-1 en *A. nidulans*, se realizaron nuevas búsquedas Blastp en la misma base de datos utilizando las secuencias de aminoácidos de las restantes Exportinas de hongos y humanos, encontrando los posibles candidatos para todas las secuencias analizadas (Fig. I.2A). Entre las posibles exportinas encontradas están: el locus *AN8787.3* que se designó *kapM*, y codifica para el posible ortólogo de la exportina Los1p/Exportina-t; el locus *AN3012.3*, *kapL*, que codifica al posible ortólogo de la exportina Msn5/Exportina 5; y el locus *AN6591.3*, *kapE*, que codifica el posible

ortólogo del exportador específico de la Importina α , Cse1p/CAS. Por lo tanto la secuencia codificada por *kapK* corresponde al posible ortólogo de CRM1/Exportina-1.

La caracterización de las versiones genómica y cDNA del gen *kapK* mediante técnicas de PCR reveló que la región codificante está dividida en 11 exones (Fig. I.2B) cuya traducción conceptual daría lugar a una proteína de 1.072 aminoácidos con un peso molecular estimado de 123,35kDa. Tras la comparación de estos resultados con la predicción de la base de datos para el locus *ANI401* se encontraron discrepancias en el número de exones y, por lo tanto, en la secuencia de la proteína, por lo que se procedió a su modificación en la base de datos de GeneBank (número de acceso AAS68344). El locus *kapK* se localiza en el brazo derecho del cromosoma VIII, próximo al centrómero, no estando asociado a otros loci codificantes de elementos involucrados en el sistema de importación o exportación nuclear.

La estructura primaria de KapK es muy similar a la conocida o pronosticada para los homólogos de la Exportina-1 en otros hongos y metazoos. En su extremo amino terminal posee el denominado “dominio de unión a Importina β ” (IBN_NT) que solapa con la región CRIME previamente descrita por Fornerod *et al.*⁷⁹ y por la cual se debe producir la interacción con Ran en su estado Ran-GTP. Al igual que ocurre en los miembros de la subfamilia de la Exportina-1, KapK contiene una región central conservada (CCR), situada entre los residuos 400 y 696, donde se deben encontrar los residuos implicados en la interacción directa con la NES de los diferentes cargos que transporta (Fig. I.2C). La secuencia de aminoácidos de KapK posee un 95% y 73,8% de similitud con las hipotéticas Exportinas-1 de *Aspergillus fumigatus* y *Neurospora crassa*, respectivamente; y un 63,3% con CRM1 de *S. pombe*. El porcentaje de identidad entre KapK y sus homólogos Crm1p de *S. cerevisiae* y la Exportina-1 de humanos es del 53% en ambos casos, lo que pone de manifiesto el elevado grado de conservación de este exportador nuclear entre especies muy distanciadas taxonómicamente.

2. *kapK* es un gen esencial.

Para caracterizar funcionalmente el gen *kapK*, se generó su alelo nulo mediante reemplazamiento génico sustituyendo la región codificante del locus *kapK* por el gen *pyrG* de *Aspergillus fumigatus*. Para ello se generó mediante PCR de fusión una construcción consistente en el gen *pyrG* de *A. fumigatus* (*pyrG^{Afum}*) flanqueado por el

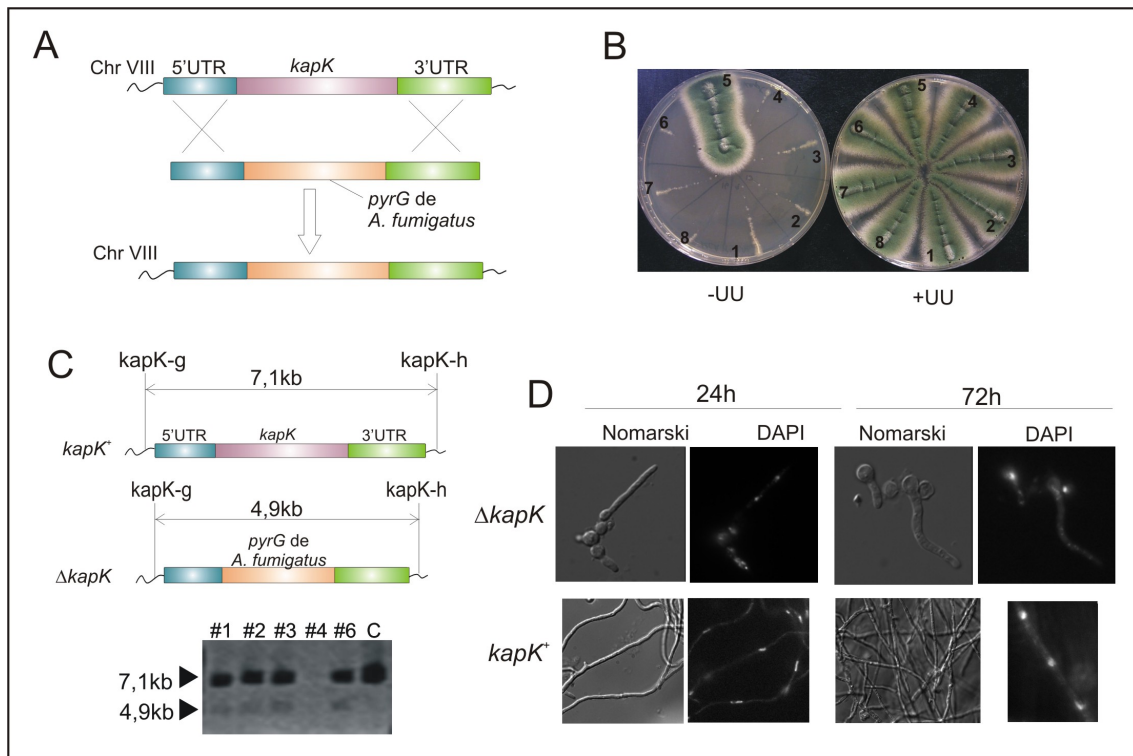


Figura I.3: Análisis del alelo nulo de *kapK*. **A)** Representación esquemática del reemplazamiento del gen silvestre situado en el cromosoma VIII por el fragmento obtenido mediante la PCR de fusión para generar el alelo nulo. **B)** Análisis de los transformantes obtenidos. La placa de la derecha contiene uracilo y uridina por lo que permite el crecimiento de todos los clones; en la placa de la izquierda, sin pirimidinas, sólo pueden crecer aquellas cepas que llevan el alelo $\Delta kapK$. La ausencia de crecimiento en esta placa indica que el alelo nulo de *kapK* resulta letal para *A. nidulans*. **C)** Resultado de las PCRs realizadas sobre DNA de los transformantes con los oligonucleótidos *kapK-g* y *kapK-h*; C corresponde al DNA de la cepa parental utilizado como control. **D)** Crecimiento de la cepa $\Delta kapK$ comparada con la cepa *kapK*⁺ tras 24h y 72h de crecimiento en WMM a 25°C. La tinción con DAPI permite observar la morfología de los núcleos.

promotor y el terminador de *kapK* (Fig. I.3A) (ver apartado 4.1 de Materiales y Métodos). Esta construcción se transformó en la cepa MAD1425 portadora de la mutación *pyrG89*. Los transformantes se seleccionaron por prototrofia a pirimidinas observándose la formación de colonias no uniformes que mostraban sectores de aspecto arborescente y escasa esporulación, fenotipo típico de los heterocariontes, indicando que el alelo nulo de *kapK* era letal. Para confirmar este resultado se realizó un test de crecimiento con conidiosporas procedentes de los transformantes heterocariontes en medio con (+UU) y sin (-UU) uracilo y uridina. Las conidiosporas de *A. nidulans* son uninucleadas, lo que permite estudiar en homocariosis el fenotipo derivado de los alelos nulos generados (ver Introducción General). Conidiosporas procedentes de diferentes transformantes crecieron normalmente en medio +UU pero fueron incapaces de crecer en medio -UU (Fig. I.3B), corroborando la hipótesis de que el reemplazamiento de la

CDS de *kapK* por el gen reportero *pyrG^{Afum}* causaba la letalidad en los transformantes. El estado heterocariótico de los transformantes analizados fue confirmado mediante amplificación por PCR del casete de reemplazamiento con oligonucleótidos externos a la construcción utilizando como molde el DNA de los transformantes (oligonucleótidos *kapK-g* y *kapK-h* de la tabla 2). Como resultado de estas PCRs se obtuvieron dos bandas de diferente tamaño, una de 7,1kb procedente del núcleo silvestre y otra de 4,9kb procedente del núcleo transformado. En el caso de la cepa receptora de la transformación, utilizada como cepa control, sólo se obtuvo una banda de 7,1kb (Fig. I.4C). El conjunto de estos experimentos mostraba que el alelo $\Delta kapK$ da lugar a un fenotipo letal y por lo tanto se concluyó que KapK es una proteína esencial para *A. nidulans*.

Para caracterizar el fenotipo terminal del alelo $\Delta kapK$, se realizó un análisis microscópico de la germinación de conidios procedentes del heterocarionte en medio líquido selectivo. Tras 24h de incubación a 25°C en medio mínimo líquido -UU, donde sólo podían crecer los conidios que llevasen el alelo nulo, la mayoría de los conidios fueron capaces de emitir tubo germinativo si bien la longitud de dichos tubos fue mucho menor que la observada en la cepa silvestre utilizada como control. A las 72h esta diferencia fue mucho mayor puesto que las hifas portadoras del alelo nulo tenían un tamaño similar al observado a las 24h, mientras que las hifas de la cepa control habían alcanzado un gran desarrollo (Fig. I.3D). Aquellos conidios que fueron incubados en medio +UU presentaron el mismo grado de desarrollo que la cepa silvestre control dado que en estas condiciones pueden crecer los conidios que no llevan el alelo nulo (resultados no mostrados). Adicionalmente, se realizó una tinción con DAPI (ver sección 8.1 de Materiales y Metodos), colorante que se une al DNA, permitiendo observar los núcleos con el fin de determinar si se habían producido divisiones nucleares. A las 24h de incubación en la mayoría de las hifas portadoras del alelo nulo de *kapK* se observaron dos acumulaciones fluorescentes que debían corresponder a dos núcleos, indicando que la ausencia de KapK no debe impedir que se produzca la primera mitosis aunque no se han observado hifas/gemínulas con más de dos núcleos lo que sugiere que el ciclo celular debe estar seriamente dañado tras la salida de la primera mitosis y entrada en fase G1. Es interesante hacer notar que tras 72h de incubación no se observó ninguna zona de acumulación del colorante por lo que los núcleos debían estar totalmente fragmentados lo que indica que ha debido ocurrir muerte celular o apoptosis (Fig. I.3D).

3. Generación de un alelo de *kapK* sensible a leptomicina B.

En estudios anteriores a este trabajo se había puesto de manifiesto el carácter esencial de CRM1 tanto en *S. cerevisiae*⁷⁷ como en *S. pombe*⁷⁶. En el apartado 1.1 de la Parte I se ha demostrado que KapK es esencial en *A. nidulans*, además, la búsqueda en la base de datos genética de *A. nidulans* y en su bibliografía específica mostró la ausencia de cepas aisladas previamente por otros grupos con mutaciones en este gen. Por ello, se decidió construir un mutante condicional de KapK que afectase a su capacidad de transportar cargas.

Una vez que se verificó la región codificante de *kapK*, mediante la secuenciación del cDNA, se pudo confirmar la presencia de un residuo de treonina en la posición 525 en lugar de un residuo de cisteína. Basándose en la hipótesis de Kudo *et al.*⁸⁹, en la que la ausencia de Cys525 debe causar el fenotipo de resistencia a LMB y en el alto nivel de conservación con otras Crm1p/Exportina-1, se construyó un alelo de *kapK* que debería causar sensibilidad a leptomicina B (ver introducción Fig I.1 panel D). Utilizando técnicas de mutagénesis dirigida mediante PCR y los oligonucleótidos T520C-F y T520C-R (ver tabla 2), el codón (ACG) Thr525 se transformó en un codón para cisteína (TGT) (ver sección 3.1 de Materiales y Métodos, plásmido pKAPK1). Este alelo mutante en el *locus kapK* que comprende la integración en copia simple del plásmido mutagénico se ha designado como *kapK1*. La figura I.4A muestra un esquema del plásmido que se utilizó y cómo debía ocurrir la inserción para conseguir el alelo mutante *kapK1*. Los transformantes fueron seleccionados por prototrofia para biosíntesis de pirimidinas y analizados en medio mínimo de *Aspergillus* sólido conteniendo 10µg/ml de LMB. Nueve de los cincuenta transformantes analizados mostraron ausencia de crecimiento en presencia de LMB. Congruentemente, todos los transformantes sensibles a LMB llevaban una o más copias del plásmido en el *locus kapK* (Fig. I.4) y, como se esperaba, la mutación Thr525(ACG)/Cys(TGT) estaba presente en la copia de la Exportina-1 que se expresaba. En ausencia de LMB estas cepas mostraron un crecimiento indistinguible de la cepa receptora.

Para confirmar el fenotipo del alelo *kapK1*, dos transformantes primarios fueron analizados genéticamente. Éstos se cruzaron con una cepa *pyrG89* y se analizó en la progenie la segregación del marcador genético de *N. crassa pyr-4*, contenido en el plásmido integrado en el *locus kapK*, respecto a la mutación Thr525(ACG)/Cys(TGT), que fue analizada por PCR, secuenciación del producto de ésta, además de por sensibilidad a LMB. Toda la progenie protótrofa para uracilo y uridina portaba el alelo

kapK1 y era sensible a LMB. A partir del alelo *kapK1* y mediante la técnica de “pop-out” (ver sección 5.2 de Materiales y Métodos), se seleccionó un reemplazamiento génico de la región codificante silvestre de *kapK* por la que expresaba KapK^{T525C}. Este nuevo alelo mutante de *kapK* fue denominado *kapK2* (Fig. I.4B). Las cepas portadoras de los alelos mutantes *kapK1* y *kapK2* mostraron el mismo fenotipo de sensibilidad en presencia de LMB. Debido a estos resultados y al ligamiento genético de la mutación Thr525(ACG)/Cys(TGT) y *pyr-4* de *N. crassa* se decidió continuar el trabajo utilizando las cepas que llevaban una única copia integrada del plásmido, es decir el alelo *kapK1*.

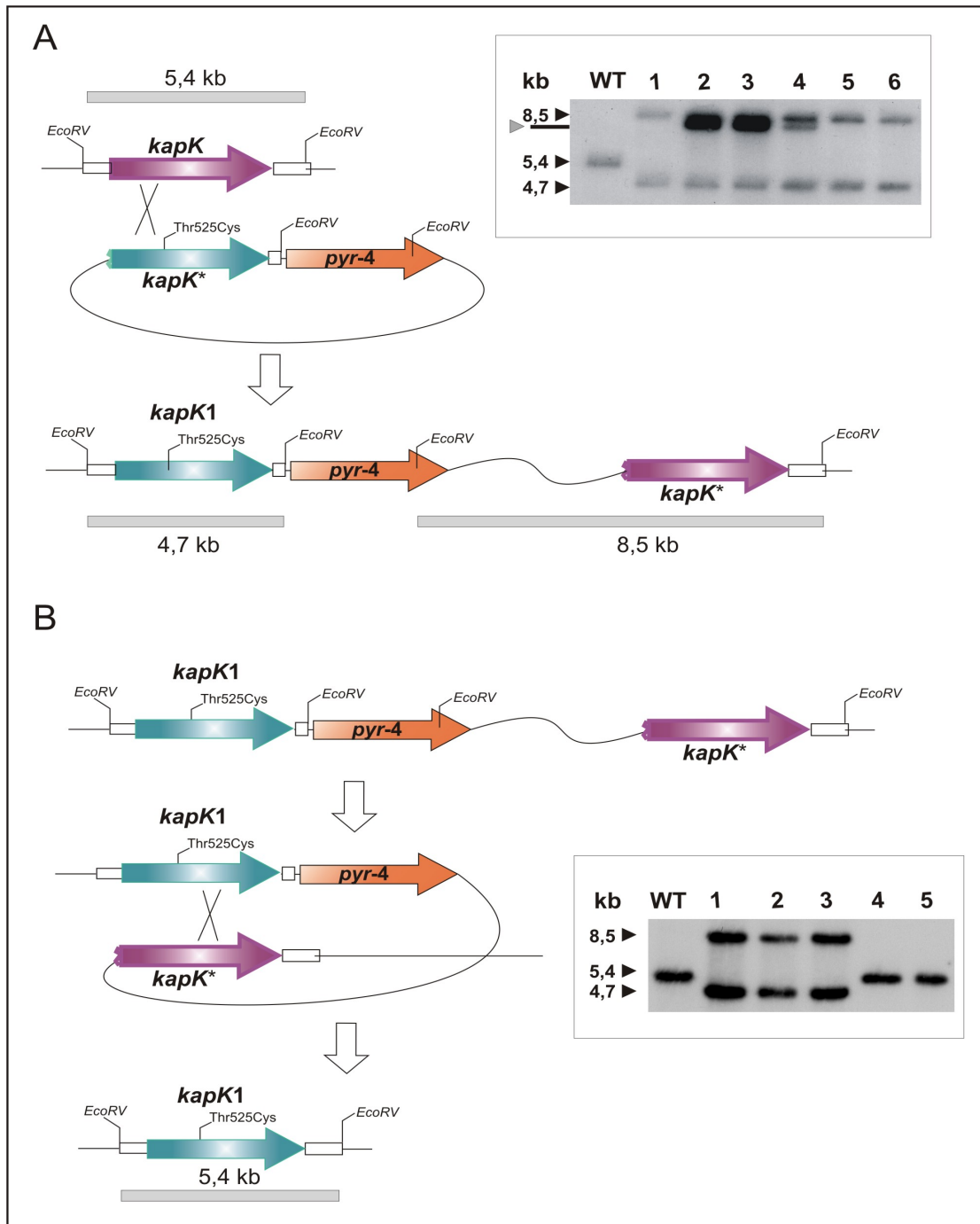


Figura I.4: Construcción del alelo *kapK* sensible a LMB. **A)** Representación esquemática de la inserción del plásmido en el *locus kapK* silvestre para generar el alelo *kapK1* mutante. El plásmido lleva una versión truncada a partir del quinto codón del gen (indicado como *kapK**) y el cambio Thr525Cys. Una integración homóloga por un suceso de recombinación, anterior a la mutación *kapK1* del plásmido, resulta en una copia completa del gen de la exportina con la mutación *kapK1*. Los transformantes fueron seleccionados por prototrofia para pirimidina por complementación heteróloga de la mutación *pyrG89* con el gen *pyr-4* de *Neurospora crassa*. Las cepas sensibles a LMB fueron analizadas por southern-blot utilizando una sonda interna al gen *kapK*. El cambio de movilidad de la banda silvestre de 5,4kb (wt), obtenida al digerir con *EcoRV*, a dos bandas de 4,7kb y 8,5kb muestra que se ha producido una integración simple en el *locus kapK* (cepas 1, 5 y 6). Una doble recombinación (cepa 4) o subsiguientes integraciones (cepas 2 y 3) resultan en una banda adicional de 7,7kb, indicada en la figura con una punta de flecha y una barra negra. **B)** Dibujo donde se muestra el posible evento de recombinación homóloga que permitiría el “pop-out” del plásmido tras ser inducido por el tratamiento con 5²-FOA. Los auxotrofos para uracilo fueron analizados por southern-blot. La presencia de una banda de 5,4kb al digerir con el enzima *EcoRV*, como en la cepa silvestre, y la posterior secuenciación del gen *kapK* confirmaron la generación del alelo *kapK2*

3.1 Efecto del alelo *kapK1*, sensible a leptomicina B, en la ruta general de exportación nuclear en *Aspergillus nidulans*.

Para estudiar el efecto de la exportina mutante KapK1 en la ruta de exportación nuclear mediada por KapK, se generaron dos fusiones fluorescentes con diferentes localizaciones celulares. Por un lado la proteína fluorescente verde (GFP) fusionada a una señal de importación nuclear clásica mono-partita (cNLS), señales que son reconocidas por el heterocomplejo Importina α /Importina β 1 (ver Introducción Parte II); y por otro la GFP fusionada a la anteriormente descrita cNLS junto con una señal de exportación nuclear (NES) reconocida por los miembros de la familia de la Exportina-1 (Fig. I.5A). Cuando GFP está fusionada a la NLS mono-partita del antígeno T grande de SV40 (..PKKKRKV..), la proteína de fusión se acumuló en el interior del núcleo (Fig. I.5B). La inserción de la NES clásica del inhibidor PKI- α (..SNELALKLAGLDINKTE..) entre la cNLS y GFP resultó en un cambio de localización de la quimera, estando distribuida uniformemente entre el citoplasma y el nucleoplasma (Fig. I.5B). En una cepa *kapK1*, la adición de 10ng/ml de LMB al medio no produjo ningún efecto en la localización de la quimera cNLS::GFP, cuya localización depende únicamente de la ruta de importación nuclear mediada por el heterocomplejo Importina α /Importina β 1 (ver resultados sección 2.2 Parte II). Sin embargo, la presencia de LMB produjo un cambio en la distribución de la proteína de fusión cNLS::NES::GFP. Tras 10 minutos de tratamiento la proteína de fusión se acumuló en los núcleos de la cepa *kapK1*, mientras que no se observó dicho efecto en la cepa *kapK* silvestre (Fig. I.5B). Estos resultados muestran que la LMB bloquea la ruta

de exportación nuclear dependiente de NES clásicas en *A. nidulans* y que es debido a la sustitución Thr525Cys en el alelo *kapK1*.

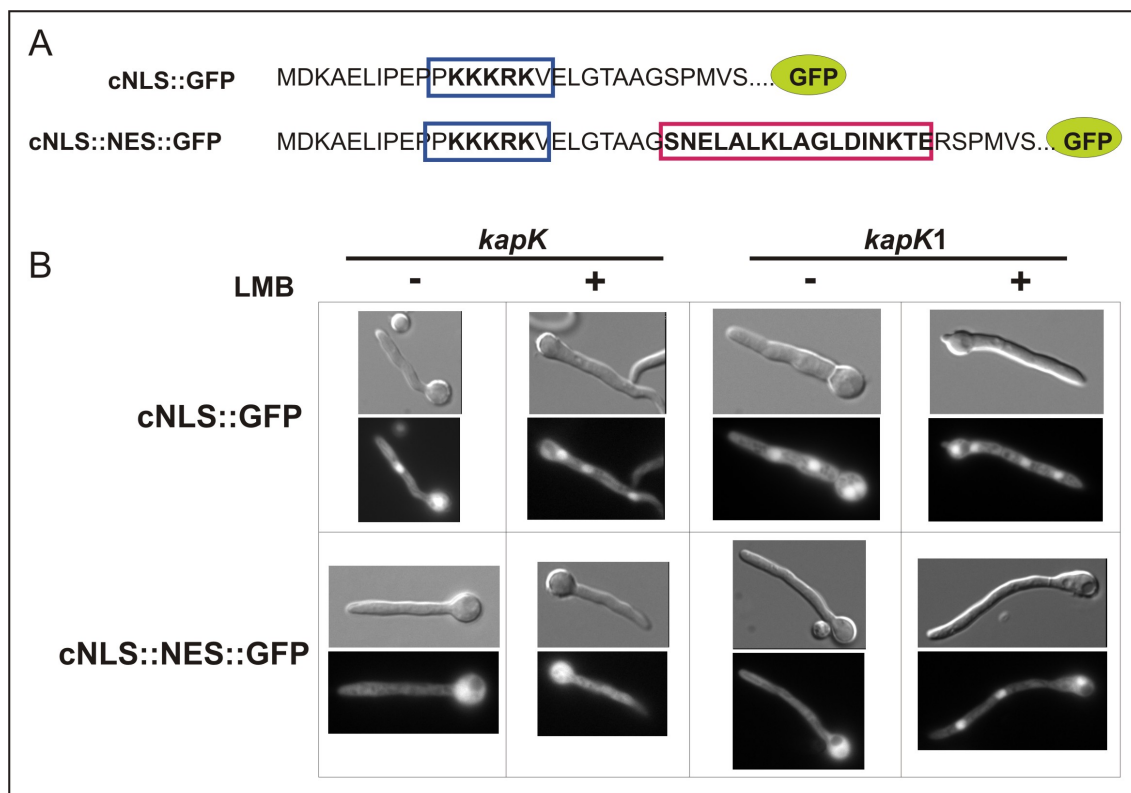


Figura I.5: Localización subcelular de las quimeras cNLS::GFP y cNLS::NES::GFP. **A)** Secuencia de aminoácidos de las quimeras utilizadas. La secuencia enmarcada en un rectángulo azul corresponde a la cNLS del antígeno T largo de SV40; con un rectángulo rojo se señala la secuencia de la NES de PKI. En ambos casos las quimeras fueron expresadas bajo el promotor inducible por etanol *alcA*. **B)** Análisis de la localización subcelular de las proteínas de fusión cNLS::GFP y cNLS::NES::GFP en una cepa silvestre y en una cepa *kapK1* mutante. Se muestra una germínula representativa para cada una de las condiciones ensayadas. Más del 80% de las hifas analizadas ($n = 30$) mostraron un fenotipo homogéneo para la localización subcelular de las quimeras en todas las condiciones.

4. Identificación de una carga natural de KapK: el activador específico de ruta NirA.

Una vez demostrado el defecto en exportación nuclear de la proteína mutante KapK1 en presencia de LMB *in vivo*, se procedió a identificar un sustrato o carga específico de esta exportina en *A. nidulans*. Coincidiendo en el tiempo, en el laboratorio del Dr. Joseph Strauss de Viena se había construido una versión fluorescente del activador específico de la ruta de asimilación del nitrato, NirA⁹¹⁻⁹³, un factor transcripcional (FT) donde recientes estudios de su localización celular habían demostrado que está sujeto a un proceso de exclusión nuclear⁹⁴. En *A. nidulans*, la utilización del nitrato implica la activación de la transcripción de los genes que

codifican para los transportadores de nitrato así como para las enzimas nitrito y nitrato reductasas, codificadas por los genes *niiA* y *niaD*, respectivamente. La activación transcripcional de estos genes ocurre bajo inducción por nitrato en ausencia de fuentes de nitrógeno represoras (amonio, glutamina) y requiere de la acción positiva del FT NirA. Cuando en el medio de cultivo hay nitrato NirA se acumula en el interior de los núcleos, pero en presencia de otra fuente de nitrógeno su localización es preferentemente citoplásmica, observándose los núcleos vacíos de fluorescencia ⁹⁴. Como se muestra en la figura I.6 y en los vídeos 1 y 2 asociados a ella, en un medio con amonio como fuente de nitrógeno NirA se localizó preferentemente en el citoplasma. Sin embargo, cuando se añadió nitrato al medio se produjo una rápida entrada al núcleo de este regulador transcripcional (panel A). La sustitución del medio de cultivo que contenía nitrato por medio con amonio causó de nuevo la rápida salida del núcleo de NirA (panel B). Esta exclusión nuclear sugería que NirA estaba sujeta a un mecanismo activo de salida del núcleo al citoplasma y por lo tanto dicha proteína debería contener una señal de exportación nuclear.

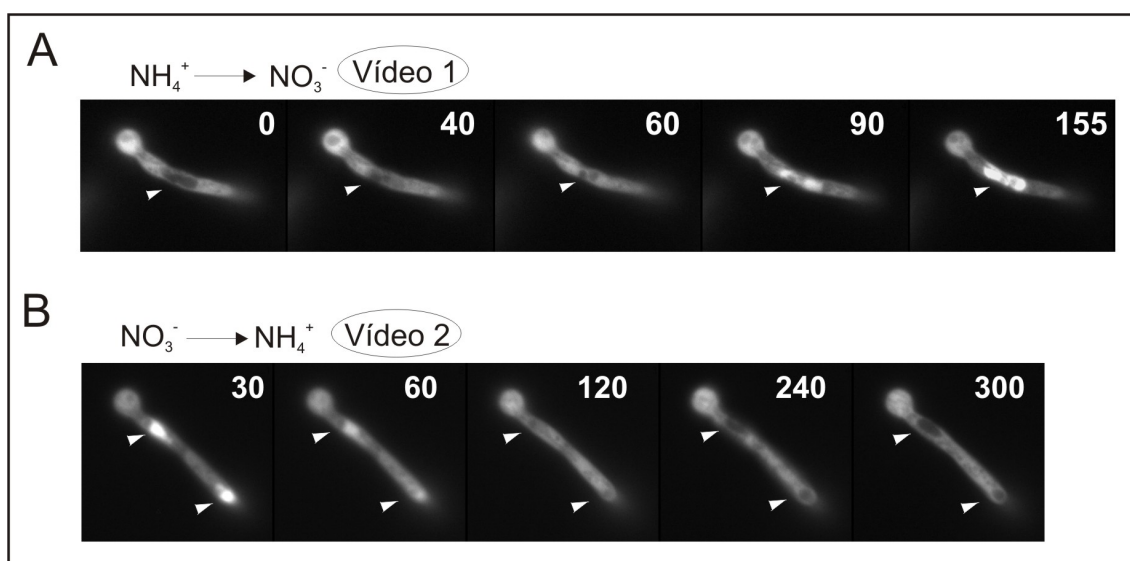


Figura I.6: Exportación nuclear de NirA inducida por amonio. **A)** Experimento de observación *in vivo* del proceso de entrada al núcleo de NirA como consecuencia de la adición de un medio con nitrato como fuente de nitrógeno (vídeo 1). **B)** Salida del núcleo de NirA inducida al cambiar el medio con nitrato por un medio que lleva amonio como fuente de nitrógeno (vídeo 2). En el margen superior derecho de cada fotograma se muestra el tiempo, en segundos, transcurrido desde el cambio de medio. Los vídeos 1 y 2 asociados a esta figura se encuentran en el CD adjunto.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de NirA con las de otros homólogos fúngicos reveló la presencia de una secuencia altamente conservada que

muestra gran parecido con la secuencia consenso de la NES que es reconocida por los transportadores miembros de la familia Crm1p/Exportina-1 (Fig. I.7A). El grupo del Dr. J. Strauss (consultar artículo “Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*” del Anexo) había caracterizado un mutante de ganancia de función en *nirA*, el alelo *nirA^c-1*. La proteína mutante se acumulaba en el interior del núcleo en cualquier condición ensayada y la secuenciación de dicha mutación mostró que un residuo de glicina situado en la putativa NES clásica era sustituido por una valina. Estos resultados previos sugerían que NirA debía de ser una carga de la exportina KapK, por lo que se comenzó un trabajo en colaboración con el laboratorio de Viena con el objetivo de analizar *in vivo* la ruta de exportación de NirA utilizando el alelo condicional *kapK1*.

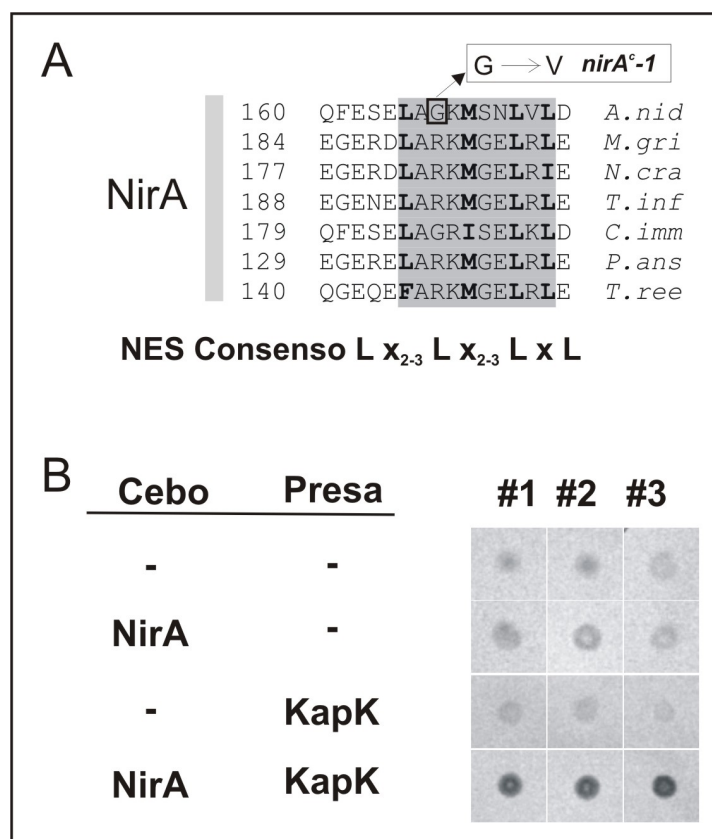


Figura I.7: Interacción entre NirA y la exportina KapK. **A)** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los ortólogos de NirA en diferentes organismos de la región donde se encuentra localizada la NES consenso. L representa residuos de Leu, Phe, Met o Ile. Las abreviaturas de los organismos corresponden con: *A. nid*, *Aspergillus nidulans*; *M. gri*, *Magnaporthe grisea*; *N. cra*, *Neurospora crassa*; *T. inf*, *Tolypocladium inflatum*; *C. imm*, *Coccidioides immitis*; *P. ans*, *Podospira anserina*. **B)** Experimento de doble híbrido que muestra la interacción entre KapK y NirA para tres clones diferentes.

Para verificar la existencia de interacción directa entre NirA y KapK se realizó un ensayo de doble híbrido. Se detectó interacción entre KapK y NirA a través de la actividad del gen reportero del sistema, el enzima β -galactosidasa (Fig. I.7B). Como control se analizó también por doble híbrido la posible interacción de KapK con un fragmento de PacC, el factor de transcripción implicado en la respuesta a pH, que contiene una secuencia de aminoácidos que se ajusta a una NES clásica, sin embargo, no se detectó interacción PacC-KapK (resultados no mostrados) lo que indicaba que la interacción KapK-NirA era específica y que en este FT debe existir una NES reconocida por esta exportina. Para determinar la relación directa de KapK como transportador de NirA se generó, mediante cruces, una cepa que expresaba la proteína fluorescente NirA::GFP en el fondo genético mutante *kapK1*.

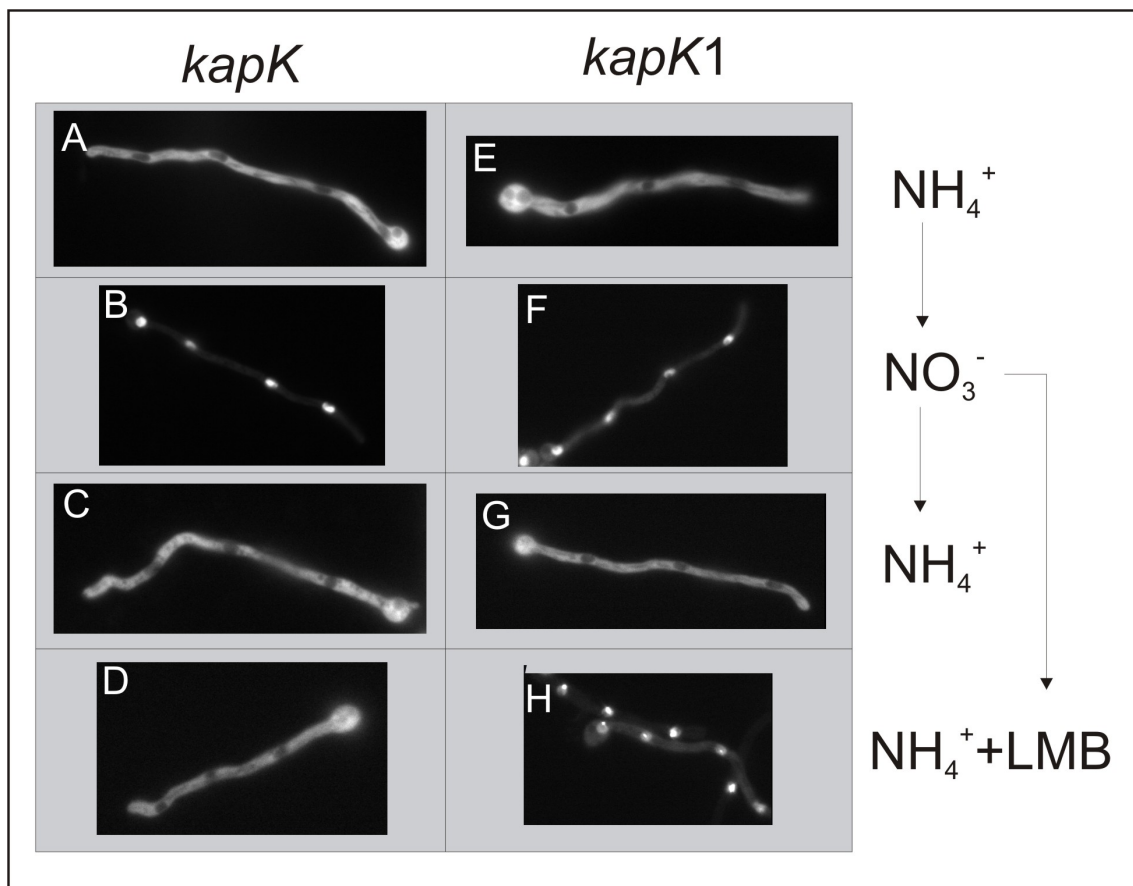


Figura I.8: Análisis *in vivo* de la exportación nuclear de NirA::GFP dependiente de KapK. De A a H, localización subcelular de NirA::GFP en las diferentes condiciones ensayadas. A la derecha se indica el compuesto utilizado como fuente de nitrógeno en el medio. A-D cepas con un fondo genético *kapK*⁺; E-H cepas portadoras del alelo mutante *kapK1*. La transferencia de las germinulas a un medio con nitrato o amonio provoca la entrada o salida del núcleo de NirA, respectivamente; en los dos tipos de cepas. La transferencia a un medio con amonio y LMB no conlleva la salida del núcleo de NirA en la cepa *kapK1* (H).

En la figura I.8 se muestra cómo la proteína mutante KapK1 es incapaz de exportar del núcleo a NirA en presencia de leptomicina B. Tanto en el fondo genético *kapK* silvestre como *kapK1*, NirA::GFP presentó una localización subcelular preferentemente citoplásmica cuando el micelio fue crecido en presencia de, o transferido a, un medio con amonio como única fuente de nitrógeno (Fig. I.8A, C, E y G). La sustitución de la anterior fuente de nitrógeno por nitrato causó la entrada y acumulación de NirA::GFP en los núcleos (Fig. I.8B y F). Cuando el medio con nitrato fue sustituido por un medio con amonio conteniendo 10ng/ml de LMB se observó la salida de NirA::GFP de los núcleos en una cepa *kapK* silvestre mientras que en la cepa *kapK1* se continuó observando una preferente localización nuclear de este FT (Fig. I.8D comparada con I.8H). Este resultado mostraba que la LMB estaba bloqueando la exportación nuclear de NirA en el fondo mutante *kapK1* de forma similar a lo observado con la quimera cNLS::NES::GFP, demostrando así que la exportación nuclear de NirA ocurría a través de la ruta de exportación mediada por KapK.

Para entender mejor los mecanismos que regulan la activación y el transporte al núcleo de NirA se decidió estudiar la localización de NirA::GFP en condiciones de no inducción y no represión. Para ello se utilizaron dos fuentes de nitrógeno no inductoras y no represoras en el circuito de regulación transcripcional por nitrógeno que es mediado por AreA: urea y arginina (Fig. I.9). El nitrato induce la transcripción de los genes que codifican para los enzimas necesarios para su asimilación y a su vez se ha observado que da lugar a la localización nuclear de NirA::GFP, mientras que el amonio tiene el efecto contrario. Es posible que el nitrato cause la activación de la NLS y, simultáneamente, de lugar a la desactivación de la NES, causando así la acumulación del factor de transcripción NirA en el núcleo. El amonio debería generar la situación opuesta. Para estudiar esta posibilidad se analizó el comportamiento de la quimera NirA::GFP bajo condiciones de cultivo no inductoras y no represoras (medio con urea o con arginina). La localización citoplásmica de NirA en presencia de las anteriores fuentes de nitrógeno indicaba que el amonio no tenía un efecto activador o represor específico sobre la actividad de la NES o la NLS, respectivamente. En el fondo genético mutante *kapK1*, el tratamiento con LMB causó la acumulación de NirA::GFP en los núcleos en presencia de urea, arginina o amonio, hecho que sugiere que la NLS no precisa ser activada por la presencia del nitrato y que es la actividad de la NES la que debe ser crucial para mantener el sistema regulador mediado por NirA inactivo en ausencia de nitrato mediante la exclusión nuclear del FT.

Estos resultados demuestran que el activador específico de nitrato NirA es un cargo natural de KapK, el ortólogo de la Exportina-1 en *Aspergillus nidulans*, y, adicionalmente, junto con los resultados obtenidos con las proteínas quiméricas, muestran que se ha generado una herramienta molecular y genética muy útil para estudiar *in vivo* la ruta general de exportación nuclear en el hongo filamentoso *A. nidulans*.

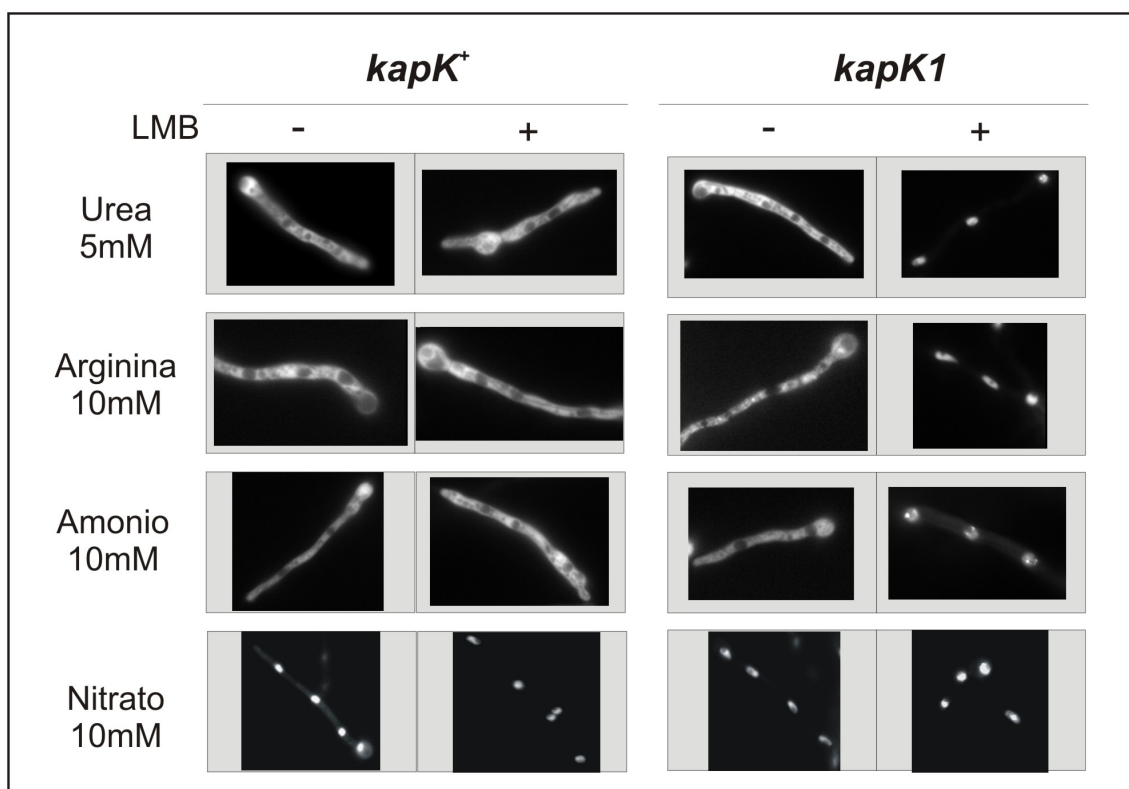


Figura I.9: Localización subcelular de NirA::GFP en diferentes fuentes de nitrógeno. Conidios de una cepa silvestre (*kapK*⁺) y una cepa portadora del alelo mutante *kapK1* fueron crecidos en medios con diferente fuente de nitrógeno. Urea y arginina son fuentes no inductoras y no represoras, el amonio es un represor del sistema y el nitrato el activador. Los símbolos + y – indican la adición o no de 10ng/mL de LMB al medio.

5. Localización subcelular de la exportina KapK.

Con el fin de caracterizar la ruta de exportación mediada por KapK se estudió la localización subcelular de este transportador. Siguiendo el protocolo de Yang et al.⁶⁷ se generó una cepa que expresaba la proteína quimérica KapK::GFP. Mediante PCR de fusión se generó una construcción *kapK::gfp::pyrG^{A.fum}* con la que se transformó la cepa MAD1425, portadora de la mutación *pyrG89* y, por tanto, auxótrofa para pirimidina. Los transformantes, seleccionados en placas -UU, no mostraron ningún defecto morfológico y varios de ellos fueron analizados mediante Southern-blot, para

comprobar que se había producido el correcto reemplazamiento del gen silvestre por la construcción generada. Por lo tanto, en vista del fenotipo del alelo nulo de *kapK*, la quimera fluorescente KapK::GFP es una proteína funcional.

La observación al microscopio de epifluorescencia de los transformantes seleccionados reveló que la proteína KapK::GFP se localizaba principalmente en el núcleo aunque también se observó una cierta fluorescencia citoplásmica (Fig. I.10A). Dentro del núcleo, en la región correspondiente al nucléolo no se observó fluorescencia alguna lo que indicaba que la proteína quedaba excluida de este orgánulo. En determinados núcleos fue posible observar acumulaciones fluorescentes distribuidas de forma similar a la observada para las proteínas estructurales del poro nuclear, como se muestra para la nucleoporina Nic96 etiquetada (Nic96::GFP) (Fig. I.10B). Esta observación sugiere que KapK se localiza transitoriamente en la proximidad de la envoltura nuclear pudiendo tratarse de zonas de asociación de la exportina con elementos del NPC.

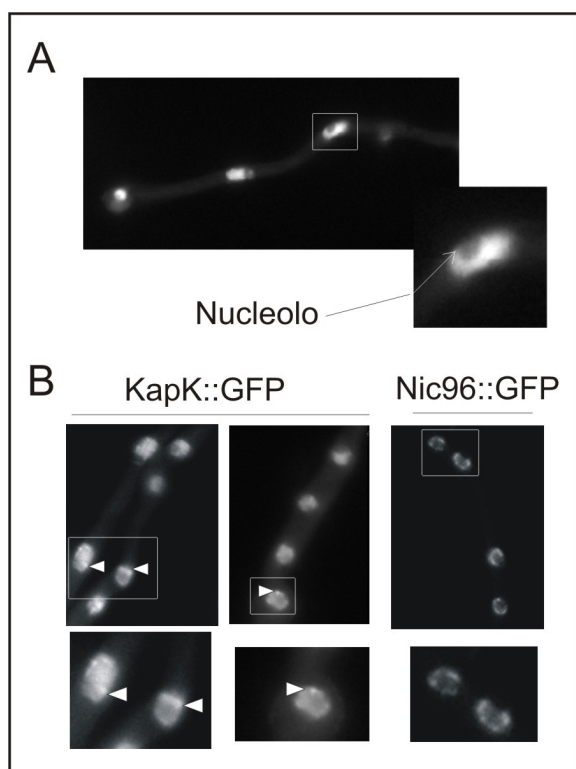


Figura I.10: Localización subcelular de KapK::GFP. A) Fotografía de la fluorescencia emitida por la proteína quimérica KapK::GFP, localizada principalmente en el núcleo. En la ampliación de la fotografía se puede observar que la proteína queda excluida del nucleolo. B) Detalle de la localización de KapK::GFP en pequeños grumos (indicados con una punta de flecha), disposición que recuerda a la localización subcelular de la nucleoporina Nic96.

Como ya se ha comentado en la introducción general, los hongos ascomicetos, incluyendo hongos filamentosos y levaduras, poseen mitosis de tipo cerrado, es decir, la membrana nuclear permanece intacta durante la mitosis manteniéndose la separación

entre el núcleo y el citoplasma⁹⁵. De Souza y col.⁵⁴ demostraron que durante la mitosis en *A. nidulans* se produce un desensamblaje parcial del poro nuclear que ha de conllevar la parada del transporte activo entre el núcleo y el citoplasma. Dada la preferente localización nuclear de KapK se procedió al análisis de su localización durante el proceso de mitosis.

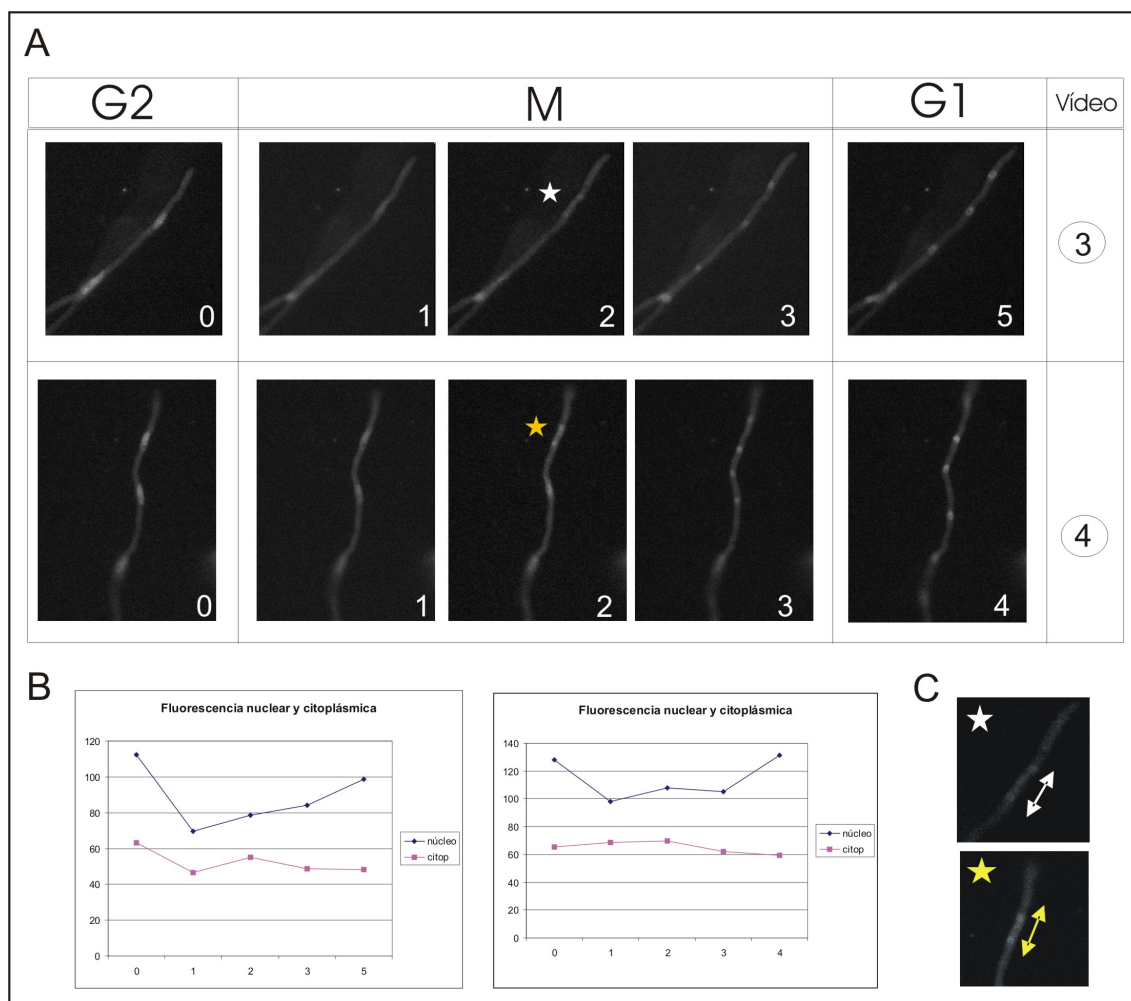


Figura I.11: Localización subcelular de KapK durante la mitosis. A) Fotografías de los vídeos 3 y 4 obtenidas utilizando un microscopio invertido de epifluorescencia. La cepa que expresa KapK::GFP se creció en WMM durante 20h a temperatura ambiente en placas con fondo de cristal. Las imágenes (1 foto/minuto) se tomaron con un objetivo de 40x y un tiempo de exposición de 1 segundo. En la parte superior de la tabla se indica el momento del ciclo celular (G2, M y G1) y en la parte inferior el tiempo transcurrido en minutos (ver vídeos 3 y 4 del CD adjunto). B) Niveles de fluorescencia nuclear y citoplásmica, el valor del eje x indica la fotografía con la que se realizó la medición. C) Amplificación de las fotografías del panel A (indicadas con una estrella) donde se puede observar con más detalle que KapK no llega a abandonar el núcleo durante la mitosis.

En el panel A de la figura I.11 y en los vídeos 3 y 4 asociados a la figura (ver CD adjunto) se muestra que la localización de la proteína KapK::GFP cambia cuando la célula entra en mitosis produciéndose una disminución de la fluorescencia nuclear (panel B), lo que indicaba que una parte de la proteína estaba saliendo del núcleo hacia el citoplasma. Si bien, como se muestra con más detalle en el panel C de la figura I.11, se pudo observar que el núcleo mitótico mantenía un nivel mas elevado de fluorescencia que el citoplasma. Durante la telofase/G1 los niveles de fluorescencia de los núcleos hijos volvieron a ser similares a los del núcleo en G2 (Fig. I.11B). Estos resultados sugieren que, aunque el transporte activo desaparece durante la mitosis, al menos una cierta cantidad del principal exportador permanece retenido en el núcleo sugiriendo la existencia de interacciones con proteínas o estructuras nucleares durante la mitosis. Esta distribución parcialmente citoplásmica y nuclear durante la mitosis contrasta con la observada para otros transportadores como la importina β que permanece invariable (ver resultados sección 3.1 Parte II) o con algunos componentes del poro nuclear que abandonan completamente el núcleo durante la mitosis ⁵⁴.

6. Identificación de un componente del poro nuclear involucrado en exportación nuclear.

La búsqueda de interactores de NirA mediante ensayos de doble híbrido por parte del grupo de Viena permitió identificar a la nucleoporina codificada por el *locus* AN4595. El gen AN4595 está situado en el brazo izquierdo del cromosoma III y la región codificante comprende 1.838 pares de bases. La caracterización de las versiones genómica y cDNA reveló que la región codificante de este gen está dividida en cuatro exones y su traducción conceptual da lugar a una proteína de 512 aminoácidos con un peso molecular estimado de 53,8 kDa. Los dominios funcionales presentes en esta proteína recuerdan a los descritos en las proteínas NPL1 ⁹⁶ y hRIP/Rab ^{97,98} de vertebrados. Estas proteínas contienen en su secuencia repeticiones de motivos Phe-Gly (FG) que son características de las nucleoporinas, proteínas que forman parte del complejo del poro nuclear (ver Introducción General, sección 2.4). Debido a esto se decidió denominar el gen AN4595 como *nplA*, por codificar para una proteína parecida a las nucleoporinas (*nucleoporin like*), como se ha determinado en eucariotas ⁹⁵.

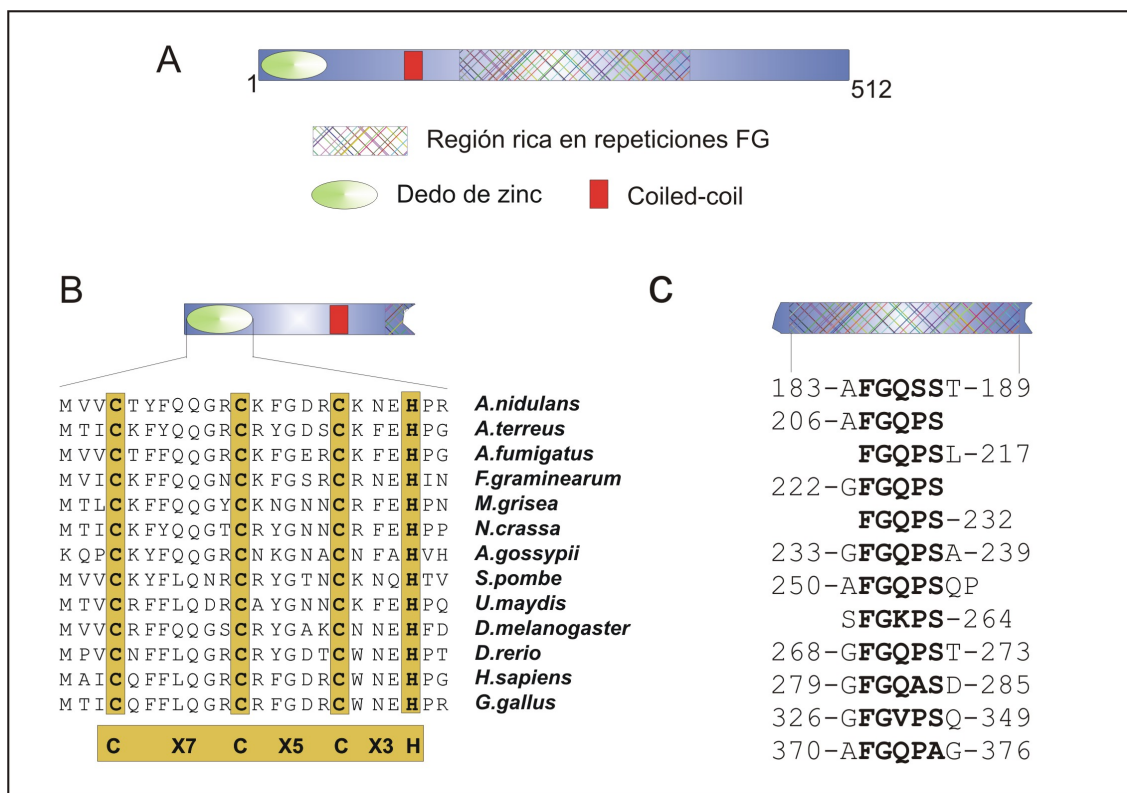


Figura I.12: Posibles dominios funcionales de NplA. **A)** Organización de los dominios detectados a lo largo de NplA. **B)** Secuencia del dedo de zinc presente en nucleoporinas de diferentes organismos. Los residuos de cisteína e histidina que definen este tipo de dominio están destacados en negro e incluidos en un recuadro. **C)** Zona rica en residuos FG donde predominan los bloques de cinco residuos que se ajustan al consenso FGQPS. Los números indican la posición del primer y último residuo.

La base de datos de proteínas de *A. nidulans* predice la existencia de un putativo dedo de zinc del tipo CCCH en el extremo N-terminal de NplA. Este dedo de zinc está presente en muchas de las nucleoporinas, similares a NplA, identificadas o pronosticadas automáticamente en hongos y metazoos. (Fig. I.12A y B). La búsqueda de otros dominios realizada a través del servidor http://www.ch.embnet.org/software/-COILS_form.html predijo un putativo dominio “coiled-coil” entre los aminoácidos 127 y 154, presente también en NPL1 (Fig. I.12A). Este tipo de dominios tienen una estructura secundaria compuesta por dos o más hélices α y están implicados en las interacciones proteína-proteína. A continuación existe una zona rica en repeticiones FG gracias a la cual es posible clasificar a NplA dentro de la familia de las nucleoporinas. Estas repeticiones FG aparecen, además de aisladas, en bloques de cinco residuos que se ajustan al consenso FGQPS (Fig. I.12C), que parece ser exclusivo de NplA ya que dicho consenso no se encuentra en otras nucleoporinas con repeticiones FG. La proteína más similar a NplA en *S. cerevisiae* es Nup42p si bien carece de dedo de zinc en su extremo

N-terminal. La comparación de las secuencias de los homologos de NplA de otras especies del género *Aspergillus* permitió definir tres regiones a lo largo de NplA. Una primera región muy conservada donde se encuentra el dedo de zinc y la posible “coiled-coil”, a continuación una región más variable en secuencia donde se localizarían la mayoría de las repeticiones FG, y de nuevo una región C-terminal muy conservada (Fig. I.13A). El grado de conservación de esta última región entre NplA y Nup42p o NPL1 es mucho menor, estando conservados únicamente los últimos residuos de la proteína (Fig. I.13B).

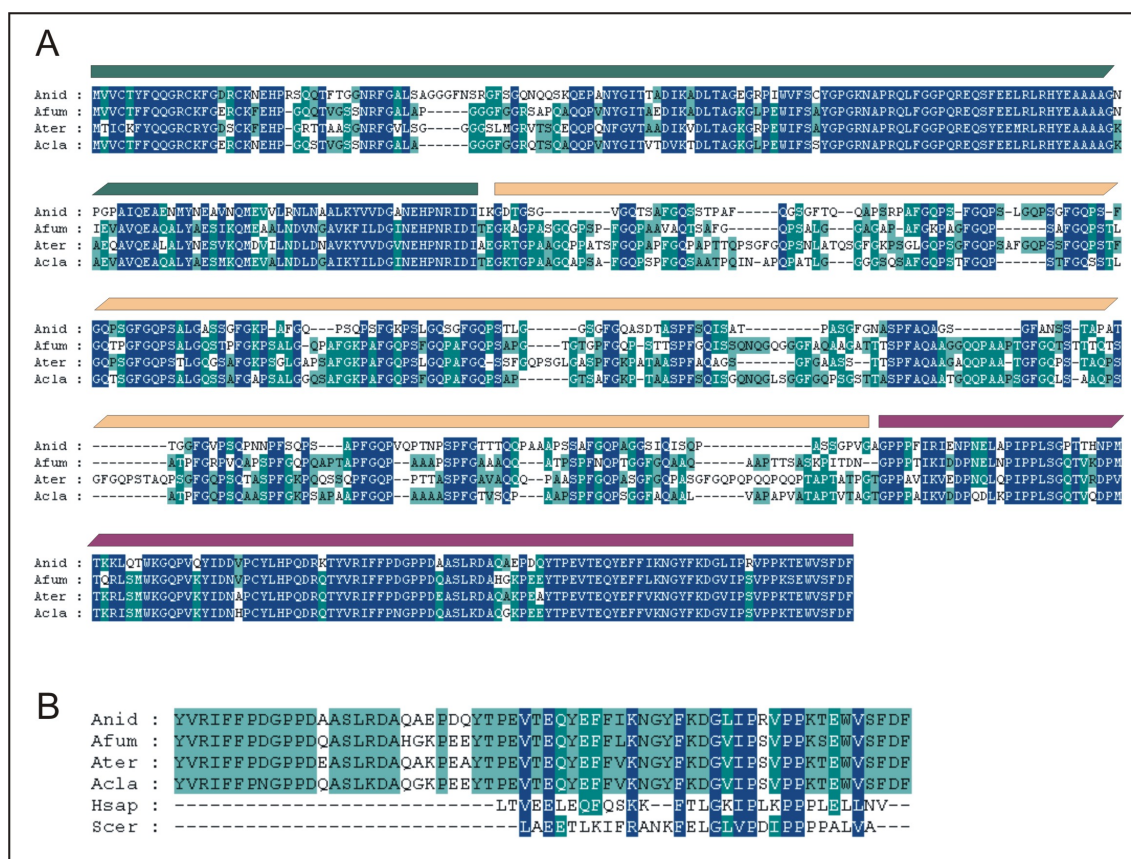


Figura I.13: Análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de NplA. A) Alineamiento de la secuencia de NplA con sus homologos en otros *Aspergillus*. En este alineamiento se pueden diferenciar tres regiones; una región amino-terminal altamente conservada (indicada en verde), la región central rica en repeticiones FG pero menos conservada (indicada en naranja) y una región carboxilo-terminal muy conservada (indicada en morado). Las abreviaturas corresponden con: Anid, *A. nidulans*; Afum, *A. fumigatus*; Ater, *A. terreus* y Acla, *A. clavatus*. **B)** Alineamiento de los últimos residuos de NplA con los posibles homologos de *Aspergillus*, *Homo sapiens* (Hsap) y *S. cerevisiae* (Scer).

6.1 NplA interacciona con la exportina KapK.

La interacción observada en el sistema de doble híbrido entre NplA y NirA no fue posible reproducirla *in vitro*, mediante ensayos de co-inmunoprecipitación con

proteínas expresadas en diferentes sistemas. Este resultado sugirió que la interacción observada *ex vivo* no era directa y que podría estar mediada por otra proteína. A la misma conclusión se llegó al tratar de repetir la interacción observada mediante ensayos de doble híbrido entre la proteína Rev del virus HIV-1 y diferentes nucleoporinas de levaduras y humanos ⁹⁶. En este sentido, se ha demostrado la formación de complejos heterotriméricos nucleoporina/exportina/carga que podrían explicar la falta de resultados en los experimentos *in vitro* ^{79,96,99}. Dada la ya demostrada implicación de KapK en la exportación nuclear de NirA, no parecía desacertado pensar en KapK como la proteína puente que facilita o permite la interacción entre NirA y NplA.

La interacción entre la nucleoporina NplA y la exportina general KapK se verificó mediante ensayos de doble híbrido (Fig. I.14). Cuando se ensayaron las fusiones correspondientes a las dos proteínas completas (KapK[1-1072] y NplA[1-512]) se observó la activación de la expresión del gen reportero, mediante tinción de los transformantes con X-Gal, (Fig. I.14B) (para más detalle consultar sección 6 de Materiales y Métodos). Los transformantes obtenidos fueron, sin embargo, incapaces de crecer en medio mínimo líquido lo que impidió realizar la cuantificación de la actividad β -galactosidasa detectada. Con el fin de determinar las regiones implicadas en la interacción se expresaron formas truncadas de NplA y KapK (Fig. I.14A). Las construcciones realizadas para estos experimentos se detallan en la sección 3.2 de Materiales y Métodos. Las diferentes regiones de NplA se expresaron fusionadas al dominio de activación de Gal4p (Gal4p^{AD}) y las versiones truncadas de KapK se expresaron fusionadas al dominio de unión a DNA de Gal4p (Gal4p^{DBD}).

Para determinar la región de KapK implicada en la interacción con NplA se ensayaron diferentes fragmentos de la exportina expresados como fusión a Gal4p^{DBD} frente a la versión completa de NplA (Gal4p^{AD}::NplA[1-512]). Como se muestra en la figura I.14C sólo se detectó activación del gen reportero con el fragmento que expresa los primeros 697 residuos de KapK (KapK[1-697]). Este resultado sugirió que la región comprendida entre los residuos 1 al 224 (comparando los resultados obtenidos con la fusiones portadoras de los fragmentos KapK[224-1072], KapK[449-1072] y KapK[224-697]) estaba implicada en la interacción con NplA. En esta región de KapK es donde se localiza el dominio CRIME. Con el objetivo de comprobar dicha hipótesis, se generó un fragmento correspondiente al extremo N-terminal de la proteína (KapK[1-255]). El resultado de doble híbrido entre NplA y este nuevo fragmento de KapK fue negativo, no detectándose actividad del gen reportero en ninguno de los transformantes obtenidos.

Estos resultados sugieren que KapK interacciona con NplA a través de la región CRIME localizada en su extremo N-terminal, siendo ésta necesaria pero no suficiente para que se produzca dicha interacción.

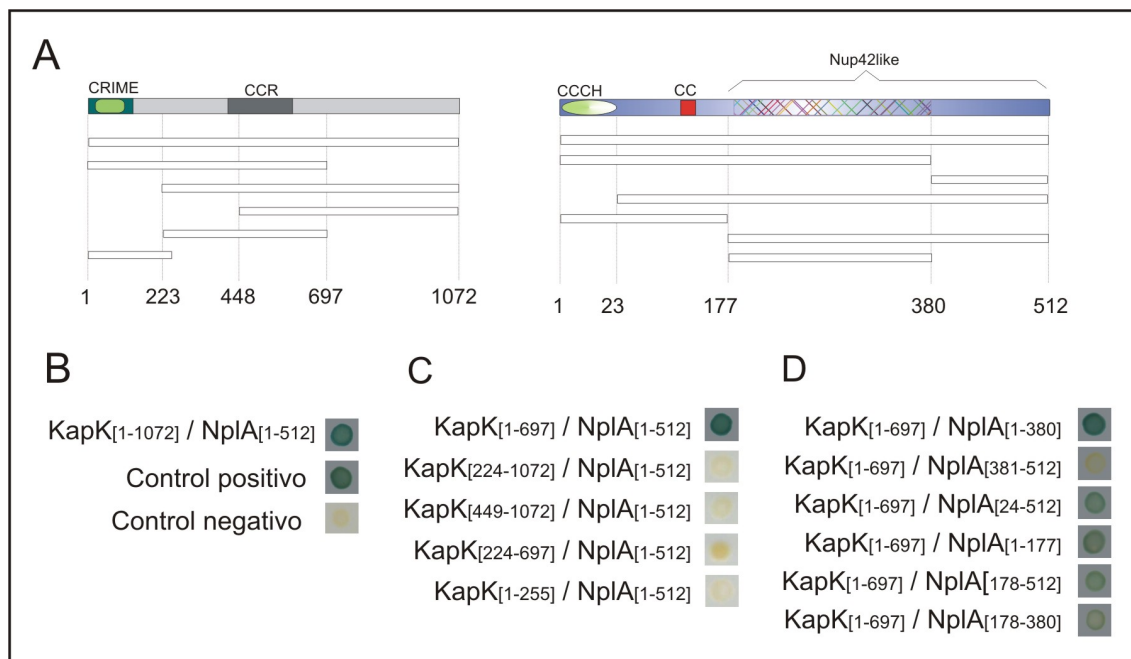


Figura I.14: Ensayo de doble híbrido entre NplA y KapK. **A)** Esquema de los diferentes fragmentos utilizados en los ensayos. Los números indican las coordenadas de las aminoácidos expresados en la levadura. **B)** Ensayos control y proteínas completas. **C)** Formas truncadas de KapK frente a la forma completa de NplA. **D)** KapK_[1-697] frente a las diferentes formas truncadas de NplA.

Una vez determinado que el único fragmento de KapK capaz de interaccionar eficientemente con NplA era el fragmento KapK_[1-697] se procedió a acotar la región de NplA implicada en esta interacción. Para ello se realizaron ensayos de doble híbrido combinando el fragmento KapK_[1-697] con las diferentes versiones truncadas de NplA. El sistema de análisis por doble híbrido detectó interacción entre KapK_[1-697] y todos los fragmentos de NplA ensayados excepto con el fragmento NplA_[381-512], la región más próxima al extremo C-terminal de la proteína (Fig. I.14D). Con los fragmentos NplA_[1-512] y NplA_[1-380] se detectó, cualitativamente hablando, una cantidad de actividad β -galactosidasa similar, lo que sumado al resultado negativo obtenido con el fragmento NplA_[381-512] sugería que KapK interacciona principalmente con las regiones “coiled-coil” y la que contiene las repeticiones FG de NplA. Con el resto de fragmentos ensayados también se detectó activación del gen reportero, aunque la intensidad de la señal obtenida fue menor que en los casos anteriores, lo que indicaría que KapK

establecería múltiples puntos de contacto con NplA a través de las regiones ricas en repeticiones FG, distribuidas a lo largo de la nucleoporina, y el dominio “coiled-coil” descrito anteriormente.

6.2 Análisis del alelo nulo de *nplA*.

La cepa $\Delta nplA$ se generó por reemplazamiento génico del *locus nplA* por el gen *argB*. Para ello se generó mediante PCR de fusión una construcción consistente en el gen *argB* flanqueado por el promotor y el terminador de *nplA*. Esta construcción fue transformada en una cepa nula para *argB* y los transformantes fueron seleccionados por prototrofia para arginina. Los transformantes obtenidos no mostraron ningún defecto de crecimiento, respecto a la cepa receptora, cuando fueron analizados en medio completo incubadas a 37°C, sin embargo, si mostraron un desarrollo colonial severamente afectado cuando fueron incubados a 42°C. (Fig. I.15A).

Dada la ya demostrada relación existente entre NplA y NirA se decidió analizar el posible efecto del alelo nulo de *nplA* en la localización subcelular de NirA::GFP. Para ello se generó una cepa $\Delta nplA$, *nirA::gfp* mediante cruzamiento de la cepa portadora del alelo nulo de *nplA* y la cepa que expresa la proteína quimérica NirA::GFP. Al analizar la progenie doblemente mutante al microscopio de fluorescencia no se observó ningún efecto debido a la ausencia de la nucleoporina sobre la localización subcelular de NirA. Adicionalmente, se realizó una medida de los niveles de expresión de los genes *niiA* y *niaD* controlados por este factor transcripcional, no observándose diferencias significativas respecto a la cepa silvestre (resultados no mostrados). Debido a la interacción *in vitro* observada entre KapK y NplA también se analizó el posible efecto del alelo nulo de *nplA* sobre KapK::GFP. Mediante cruzamiento génico se generó una cepa nula para *nplA* y que expresaba la proteína quimérica KapK::GFP. La localización subcelular de KapK::GFP fue similar en la cepa $\Delta nplA$ y en la cepa *nplA*⁺ cuando ambas fueron germinadas en medio mínimo líquido a 25°C. Sin embargo, la incubación de las muestras a 42°C provocó un aumento del nivel de fluorescencia en el interior del núcleo en la cepa $\Delta nplA$. En el panel B de la figura I.15 se ha igualado el rango de intensidad de pixels (LUT) de las fotografías para comparar la intensidad de fluorescencia KapK::GFP detectada entre la cepa $\Delta nplA$ y la cepa *nplA*⁺. En los gráficos se puede observar que el aumento de la intensidad de fluorescencia sólo se produjo en los núcleos, siendo la fluorescencia citoplásmica prácticamente similar en las dos cepas.

Estos resultados indicarían que la ausencia de la nucleoporina NplA provoca la acumulación en el interior de los núcleos de KapK, lo que pone de manifiesto de nuevo la relación directa que parece existir entre ambas proteínas.

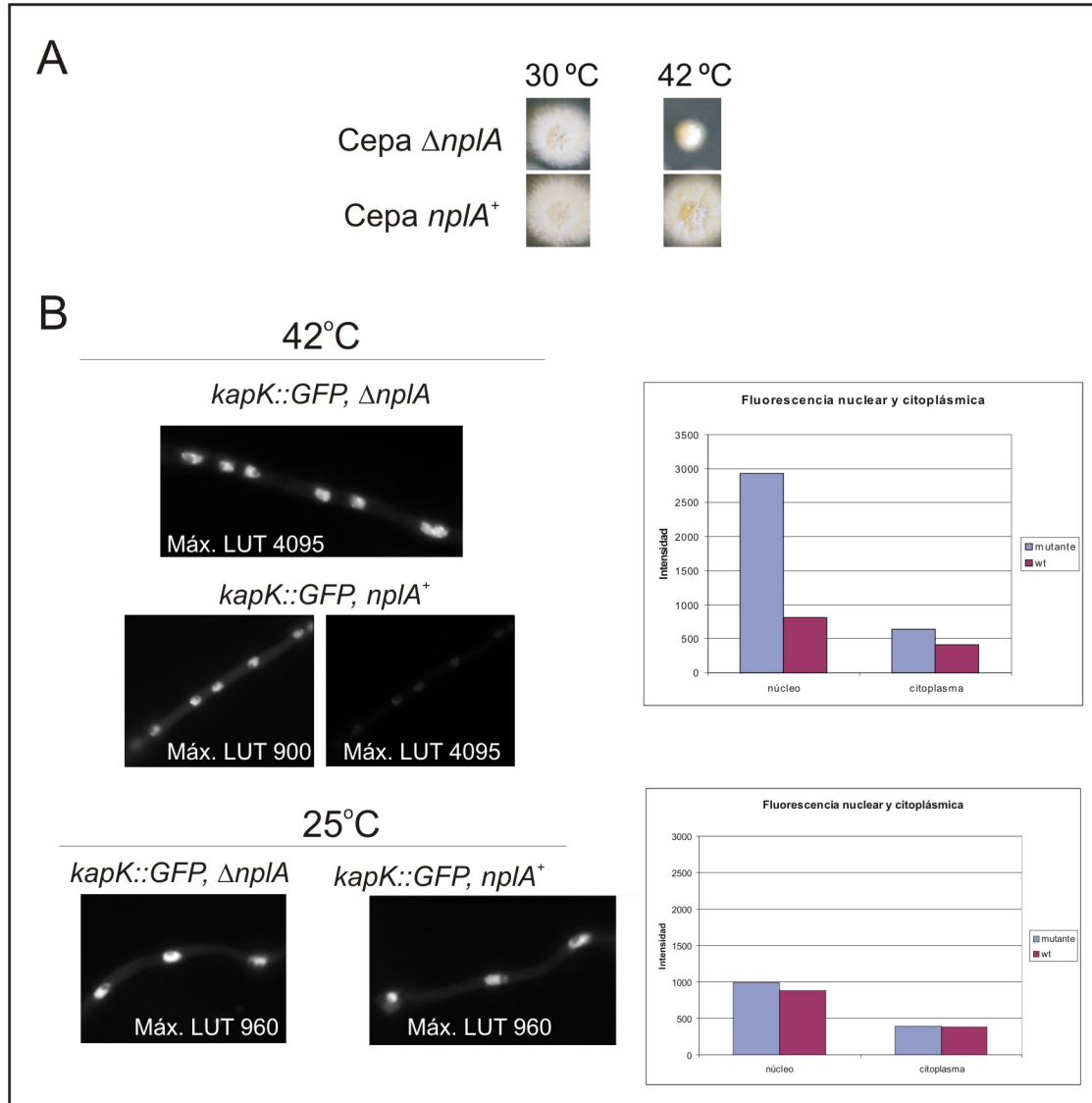


Figura I.15: Análisis del alelo nulo de *nplA*. A) Fenotipo de termosensibilidad de la cepa $\Delta nplA$ donde se observa su defecto de crecimiento a 42°. B) Efecto del alelo nulo de *nplA* sobre la localización subcelular de KapK. En las diferentes fotografías se ha igualado el rango de las intensidades de píxel de la imagen para que se pueda apreciar la diferencia en los niveles de fluorescencia. El gráfico representa los niveles de fluorescencia detectados en los núcleos y en el citoplasma en las diferentes condiciones ensayadas (n = 10 hifas para cada temperatura).

6.3 Localización subcelular de NplA.

Como se ha mencionado anteriormente, entre NplA y NPL1 de humanos existe conservación a nivel de los dominios definidos por Pfam, sin embargo, NplA se diferencia notablemente de su posible homólogo en *S. cerevisiae*, Nup42p,

principalmente por la presencia de una región N-terminal adicional. En esta región, que supone algo más del 34% de la proteína NplA, se localiza el dominio del dedo de zinc tipo CCCH y una putativa región “coiled-coil”, tras la cual daría comienzo la región que hemos denominado “nup42like”. Esta diferencia tan significativa entre las dos proteínas hizo pensar en una posible función adicional de NplA llevada a cabo a través de su región más amino-terminal. Por ello, a la hora de estudiar la localización subcelular de NplA se generaron, además de una proteína quimérica NplA::mRFP, dos versiones truncadas y etiquetadas de NplA, la primera conteniendo sólo el dedo de zinc y la región “coiled-coil”, denominada a partir de ahora como [Zn+CC], y la segunda que comprendía sólo la región “nup42like”.

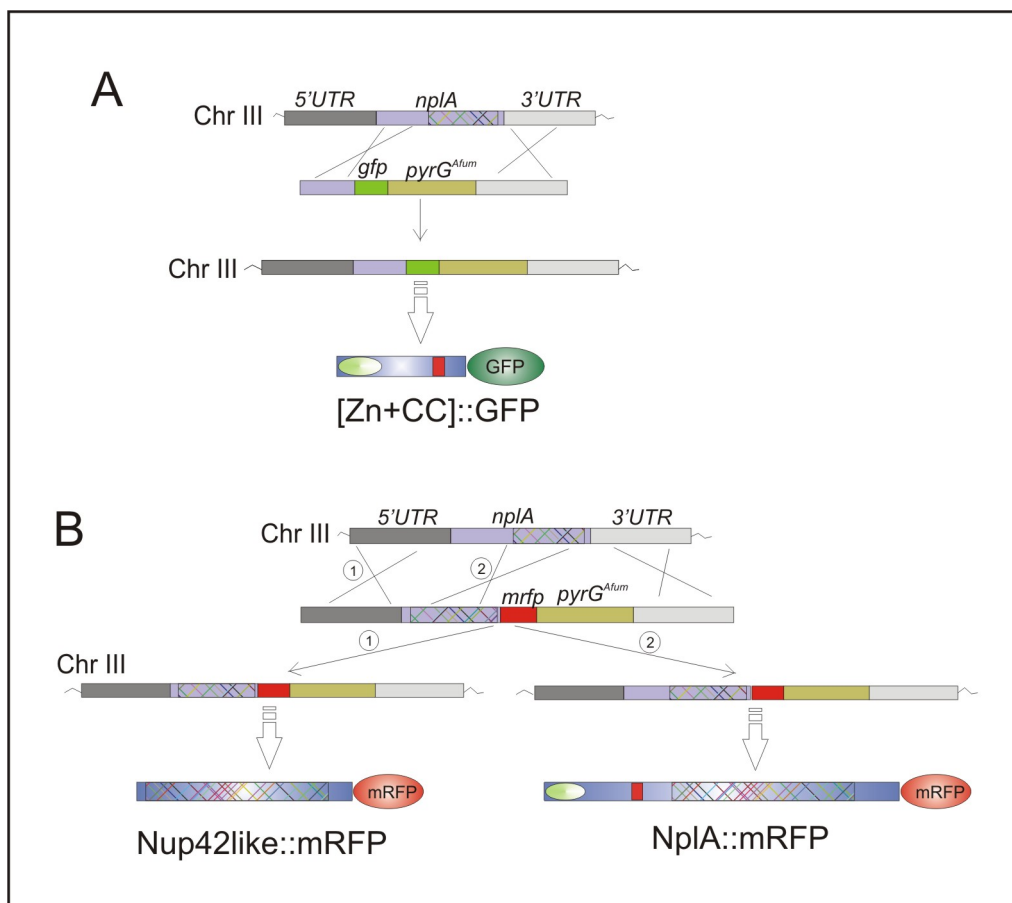


Figura I.16: Generación de las diferentes versiones etiquetadas de NplA. A) Representación esquemática del fragmento obtenido por PCR y el proceso de recombinação que tiene que ocurrir para dar lugar a un fragmento génico que codifica para la proteína [Zn+CC]::GFP. B) Representación esquemática del fragmento obtenido mediante PCR de fusión utilizado para obtener la proteína Nup42like::mRFP. Si el evento de recombinação tiene lugar entre los fragmentos 3'UTR y 5'UTR (indicado como 1 en el esquema) se consigue reemplazar la región codificante de *nplA* silvestre por la región *nup42like*. Si el suceso de recombinação se produce entre la región 3'UTR y la región *nup42like* (indicado como 2) se genera una región que codifica para la proteína NplA::mRFP.

Para generar la versión truncada de NplA correspondiente a su extremo N-terminal se reemplazó la región codificante del *locus nplA* por la construcción $[Zn+CC]::gfp::pyrG^{Afum}$, donde $[Zn+CC]$ representa la secuencia que codifica para la región $[Zn+CC]$ de NplA. En la figura I.16A se muestra una representación esquemática del fragmento obtenido mediante PCR de fusión con el que se transformó la cepa MAD1425, así como el proceso de doble recombinación necesario para que se produzca el correcto reemplazamiento génico. Siguiendo el mismo procedimiento se generó una cepa que expresaba la región “nup42like” de NplA etiquetada con mRFP así como la cepa que expresaba la versión completa de NplA etiquetada con mRFP. En este caso se generó, mediante PCR de fusión, una construcción consistente en: promotor de *nplA* + región “nup42like” + $rfp::pyrG^{Afum}$ + terminador de *nplA*. Para conseguir la versión truncada de NplA se debía producir un proceso de doble recombinación que implicara al promotor y al terminador de *nplA*; si por el contrario la recombinación se producía por el fragmento “nup42like” se obtendría una cepa que expresaría la proteína quimérica NplA::mRFP (Fig. I.16B). El análisis mediante Southern-blot de los transformantes obtenidos permitió diferenciar aquellos que expresaban la proteína Nup42like::mRFP de los que expresaban NplA::mRFP.

La observación al microscopio de la cepa que expresaba la proteína NplA::mRFP reveló que la fluorescencia se localizaba principalmente en la periferia de los núcleos, como cabría esperar para una nucleoporina (Fig. I.17A). Similares resultados habían sido observados por el grupo del profesor Stephen Osmani pero utilizando una versión de NplA etiquetada con GFP¹⁰⁰. Al analizar las cepas portadoras de las versiones truncadas de NplA se observó una fluorescencia mayoritariamente perinuclear en la cepa que expresaba la proteína Nup42like::mRFP, similar a la observada con la proteína NplA::mRFP, lo que demostraba que la región rica en repeticiones FG debe contener toda la información precisa para su localización en la envoltura nuclear. Sin embargo, la proteína $[Zn+CC]::GFP$ no mostró una localización subcelular concreta, observándose fluorescencia a lo largo de toda la hifa (Fig. I.17B).

Adicionalmente, se analizó una versión doblemente etiquetada de NplA, con mRFP fusionada en su extremo N-terminal y GFP fusionada a su extremo C-terminal (generada por el grupo colaborador austriaco). La observación al microscopio de la proteína doblemente etiquetada, sorprendentemente, reveló que la fluorescencia emitida por GFP no solapaba con la emitida por mRFP, dado que mientras que la primera se localizaba principalmente en la periferia de los núcleos, la segunda aparecía distribuida

por toda la hifa (Fig. I.17C), de forma similar a la observada para cada uno de los fragmentos truncados analizados anteriormente, [Zn+CC] y Nup42like. Estos resultados no solo situaban a NplA en la periferia del núcleo, como correspondería a una proteína del poro nuclear, sino que además indicaban que NplA se debía estar dividiendo en dos partes que presentaban diferente localización subcelular. La separación de NplA en dos fragmentos, uno de ellos conteniendo la región ausente en Nup42p, se podría interpretar como una prueba a favor de una función adicional de la parte N-terminal de NplA.

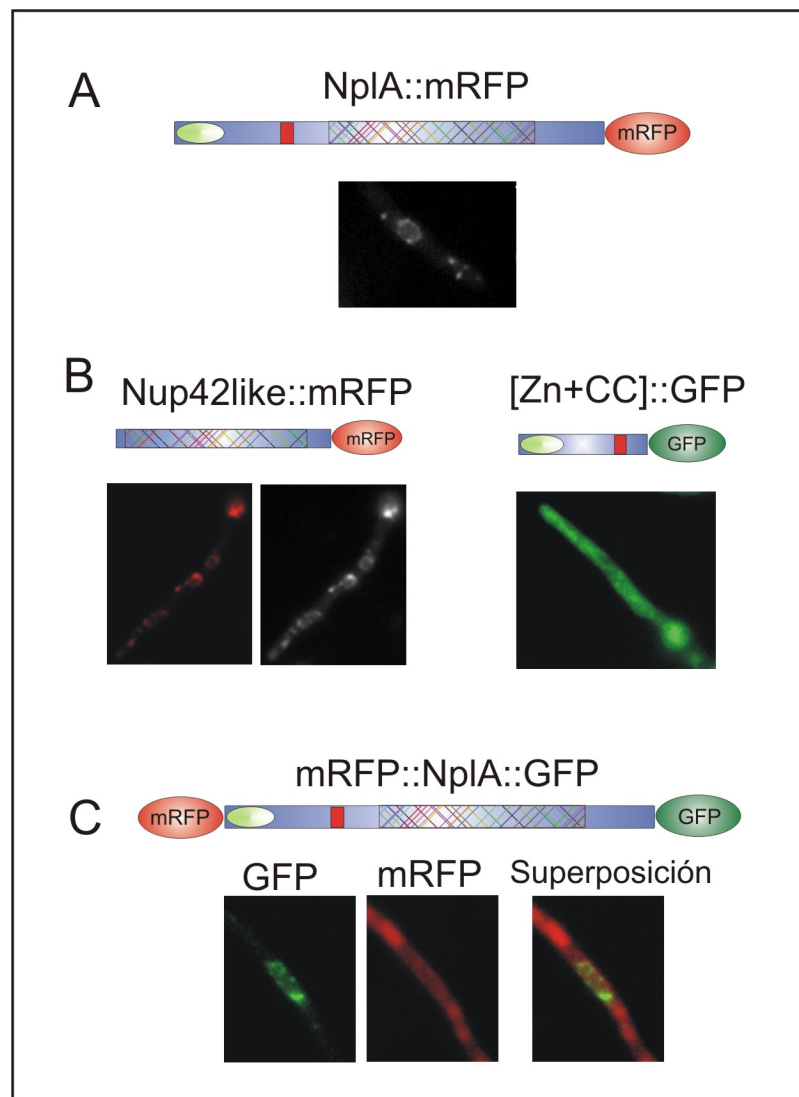


Figura I.17: Localización subcelular de NplA. A) Fluorescencia observada en la cepa que expresa la proteína NplA::mRFP. B) Resultado obtenido al analizar las cepas que expresan las versiones truncadas de NplA. Se observó una fluorescencia perinuclear en la cepa que expresaba la proteína quimérica Nup42like::mRFP y una fluorescencia generalizada en el caso de la cepa que expresaba [Zn+CC]::GFP. C) Resultados obtenidos al analizar la proteína doblemente etiquetada. Se observó una localización perinuclear al excitar la GFP y una fluorescencia distribuida por toda la hifa al excitar la mRFP, resultado que concuerda con el obtenido con las versiones truncadas de NplA.

6.4 Análisis funcional de NplA.

La presencia de una región N-terminal en NplA que no existe en su homólogo en levaduras Nup42p, así como los resultados de localización subcelular obtenidos hicieron pensar en una posible función llevada a cabo específicamente por esta parte de la proteína. Para comprobar si esta región N-terminal era necesaria para la correcta funcionalidad de la proteína se utilizaron las dos versiones truncadas de NplA que habían sido generadas para el análisis de la localización subcelular de la proteína.

Para determinar la funcionalidad de cada una de las versiones de NplA se decidió comparar su fenotipo en placa con el fenotipo de la cepa $\Delta nplA$, que presenta un grave defecto de crecimiento a 42°C. Como se puede observar en la figura I.18 el crecimiento de las cepas portadoras de las versiones truncadas de NplA fue similar al de la cepa receptora de la transformación a 37°C. Cuando las placas fueron incubadas a 42°C, ambas cepas mostraron un claro defecto de crecimiento, muy similar al observado en la cepa $\Delta nplA$. Sorprendentemente, la cepa que expresaba la versión completa de NplA etiquetada con mRFP también mostró un cierto defecto de crecimiento a 42°C, no observándose el mismo fenotipo en una cepa que expresaba la proteína NplA::GFP. Estos resultados indicaban que tanto la región [Zn+CC] como la región “nup42like” de NplA son necesarias, pero no suficientes, para el correcto funcionamiento de la proteína a 42°C y sugieren que NplA debe realizar funciones adicionales a las llevadas a cabo por Nup42p en *S. cerevisiae*, al menos a 42°C.

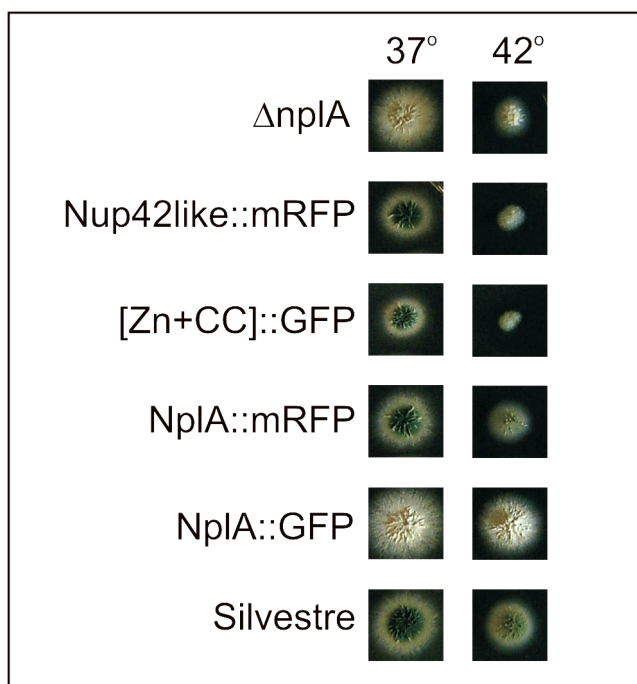


Figura I.18: Fenotipo en placa de las diferentes versiones de NplA generadas. A 42°, las cepas con las versiones truncadas de NplA (Nup42like y [Zn+CC]) presentan un fenotipo muy similar al de la cepa $\Delta nplA$. En las cepas con la completa versión de NplA sólo se aprecia un cierto defecto de crecimiento en la cepa que expresa la proteína NplA::mRFP.

6.5 NplA es una nucleoporina que se proteoliza.

Para comprobar que realmente se producía un procesamiento proteolítico de la proteína y que los resultados de fluorescencia no eran un artefacto fruto de la presencia de las proteínas fluorescentes, se realizó un doble etiquetado de NplA con epitopos más pequeños: Myc₃ y (HA)₃. Mediante PCR de fusión se generó un fragmento compuesto por: promotor de *nplA*, Myc₃, gen *nplA*, (HA)₃ y terminador de *nplA*. Este fragmento se introdujo en un plásmido autorreplicativo y se transformó en la cepa de *A. nidulans* MAD1425. En el análisis mediante “Western Blot” de un extracto total de proteínas de la cepa transformada, con anticuerpos anti-Myc y anti-HA, se observaron dos bandas de diferente tamaño, una al revelar con anti-HA y otra, de menor tamaño, al revelar con anti-Myc (Fig. I.19A). Con ninguno de los anticuerpos se observó una banda de mayor tamaño que pudiera corresponder a la proteína entera (detectada por tanto con ambos anticuerpos) lo que indicaba la ausencia de la forma entera de NplA en la célula. Esto concuerda con los resultados de microscopía en los que no se observaba solapamiento de la fluorescencia roja con la verde, como cabría esperar si la proteína etiquetada con GFP y mRFP no fuera procesada.

Adicionalmente se realizó un “Western Blot” de las diferentes versiones de NplA etiquetadas con proteínas fluorescentes. En este ensayo se utilizó la cepa que expresa la proteína Nup42like::mRFP, la cepa que expresa la proteína NplA::GFP cedida por el Prof. Steve Osmani y una cepa que expresa la proteína NplA::mRFP. El Western revelado con anticuerpos policlonales anti-GFP dio como resultado un patrón de bandas de diferentes tamaños (Fig. I.19B) lo que parecía indicar que la presencia de la GFP en el extremo C-terminal de NplA provocaba múltiples formas de la proteína. Por otro lado, en el Western revelado con anticuerpos policlonales anti-RFP se observó una banda de aproximadamente 60kDa en la cepa Nup42like::mRFP y una única banda de mayor tamaño (~98kDa) en la cepa que expresa NplA::mRFP (Fig. I.19B). Estos resultados diferían de los obtenidos para la construcción Myc₃::NplA::HA₃ pues indicaban que la proteína entera etiquetada con mRFP no se estaba procesando. Hay que recordar aquí que esta cepa que expresa NplA::mRFP no mostró un fenotipo totalmente silvestre a 42°C lo que podría ser consecuencia de la falta de procesamiento de la proteína observado mediante “Western Blot”.

Por último se decidió realizar la expresión *in vitro* de NplA utilizando los plásmidos de doble híbrido con el fin de observar si existía o no autoprocesamiento. Se expresaron *in vitro* mediante el sistema de TNT las formas NplA[1-512] (proteína

entera), NplA[24-512] (proteína sin el dedo de zinc) y NplA[178-512] (región “nup42like”) y en ninguno de los casos se observaron formas de menor tamaño de las esperadas, por lo que se descartó el autoprosesamiento (Fig. I.19C). Del conjunto de estos resultados se concluyó que la nucleoporina NplA es procesada *in vivo* en dos partes claramente diferentes, siendo este procesamiento aparentemente inhibido por la presencia de la proteína mRFP en su extremo C-terminal. Además, no parece existir procesamiento *in vitro*, lo que sugiere la existencia de una proteasa que lleve a cabo el corte proteolítico, pudiendo ocurrir éste en la proximidad del NPC de *A. nidulans*.

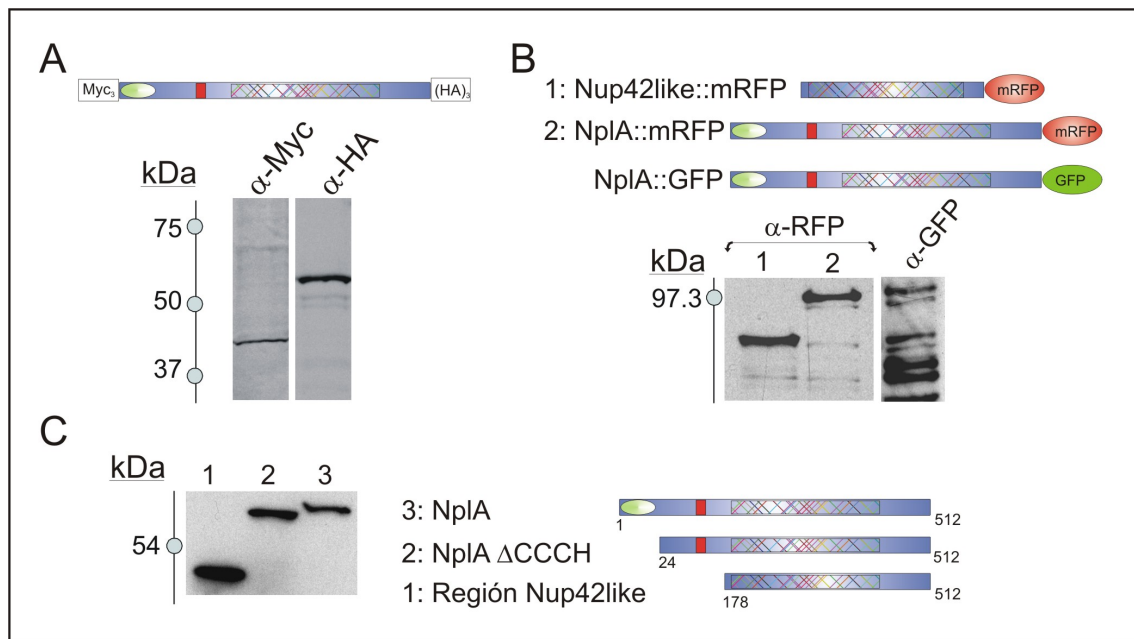


Figura I.19: Detección mediante “Western Blot” de las diferentes versiones etiquetadas de NplA. **A)** Resultado del Western-blot realizado con un extracto de la cepa que expresa una proteína etiquetada con Myc₃ y (HA)₃ donde se observan dos bandas de diferente tamaño. **B)** Resultado de los Western-blot realizados con extractos procedentes de las cepas portadoras de las versiones Nup42like::mRFP (1), NplA::mRFP (2) y NplA::GFP, revelados con anticuerpos anti-RFP y anti-GFP. **C)** Resultado obtenido al expresar *in vitro* las formas truncadas de NplA, mediante el sistema de TNT. A la derecha se muestra un esquema de cada una de las proteínas expresadas a partir del plásmido de doble híbrido pGBKT7.

El conjunto de estos resultados ha conducido a la identificación y caracterización de un elemento de la ruta general de exportación nuclear mediada por KapK, la nucleoporina NplA. Esta proteína pertenece al NPC y debe estar mediando un papel importante en el proceso de exportación nuclear en condiciones de estrés ambiental por elevación de la temperatura. Las interacciones observadas entre NirA y las proteínas NplA y KapK sugieren, como se ha descrito en otros organismos, una estrecha relación entre ellas, aunque no se ha podido demostrar que NplA sea esencial para la función

reguladora de NirA. El hecho de que NplA sea procesada en dos partes con diferente localización subcelular es un resultado que no ha sido observado en ninguno de sus homólogos, y hace que esta proteína cobre un especial interés puesto que podría desempeñar otras funciones a parte de la meramente estructural formando parte del complejo del poro nuclear.

DISCUSIÓN.

1. El sistema general de exportación nuclear en *A. nidulans*.

El principal objetivo al comienzo de esta tesis era identificar los sistemas de transporte nuclear en *A. nidulans*. La ruta general de exportación nuclear está mediada por la Exportina-1. La secuencia de aminoácidos de esta proteína está muy conservada entre proteínas homólogas de diferentes organismos lo que ha permitido identificar al ortólogo de la Exportina-1 en *A. nidulans*, designándose dicha proteína como KapK. Con el fin de comprobar que KapK era realmente el ortólogo de la Exportina-1, se buscaron posibles ortólogos para el resto de carioferinas con función exclusivamente exportadora que han sido previamente descritas en *S. cerevisiae*. De esta forma, se han identificado: el exportador específico de la Importina α Cse1p/CAS, designado como KapE/AN6591; el ortólogo de Los1p/Exportina-t denominado KapM/AN8787, que debe mediar la salida del núcleo del tRNA procesado y/o proteínas que unen RNA; y KapL/AN3012, el ortólogo del importador/exportador Msn5/Exportina-5 que media en la levadura la importación nuclear de la proteína A y la exportación de varias proteínas entre las que se encuentran los factores transcripcionales Swi6p, Far1p y Pho4p^{29,88,101}. Basándonos en los resultados obtenidos se puede concluir que el genoma de *A. nidulans* contiene posibles ortólogos para los genes que codifican para todas las exportinas genuinas que han sido previamente definidas en *S. cerevisiae*.

La Exportina-1 está implicada en la exportación de proteínas, RNAs y subunidades ribosómicas del núcleo al citoplasma. Al igual que ocurre con otras proteínas que desempeñan funciones esenciales para la célula, esta exportina está muy conservada de hongos a eucariotas superiores. Debido a ello, el mecanismo implicado en la exportación de las cargas debe ser el mismo. Según el modelo propuesto, la interacción de la Exportina con RanGTP en el interior del núcleo promueve la unión de la carga y la hidrólisis del GTP a GDP da lugar a la liberación de la carga en el citoplasma. En KapK está presente el dominio característico de las proteínas de la superfamilia importina β , el dominio N-terminal de unión a Importina β (IBN_NT). En

este dominio se localiza la región CRIME implicada en la interacción con RanGTP. En la región central de KapK los residuos de leucina, lisina y fenilalanina implicados en el reconocimiento e interacción con la carga también están conservados. Por tanto, el mecanismo general de exportación nuclear en *A. nidulans* debe ser similar al descrito en otros organismo.

Al igual que ocurre en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, una cepa de *A. nidulans* portando el mutante nulo de *kapK* es inviable, demostrando que, a pesar de la existencia de otras exportinas, la función desempeñada por KapK es vital para el hongo y no puede ser llevada a cabo por otras carioferinas. Debido a esto, para estudiar la ruta de exportación nuclear es necesaria la generación de una mutación condicional de la proteína. La leptomicina B (LMB) es una droga que afecta específicamente a la ruta de exportación nuclear debido a su capacidad para interaccionar con un residuo de cisteína localizado en la región central de la exportina. Trabajos teóricos realizados por Kudo *et al.*⁸⁹ sugerían que la presencia o ausencia de este residuo de cisteína era suficiente para hacer a la proteína sensible o resistente, respectivamente, al compuesto antifúngico. La Exportina-1 de *A. nidulans* presenta un residuo de treonina en la posición de la región central donde debería estar el residuo de cisteína, lo que hace a la proteína resistente a la LMB. Según la hipótesis de Kudo *et al.*⁸⁹ un cambio puntual del residuo de treonina por un residuo de cisteína sería suficiente para volver al hongo sensible a la droga. En este trabajo se ha demostrado que esta hipótesis es cierta. Se han generado dos alelos, *kapK1* y *kapK2*, que codifican para una versión de KapK que porta el cambio Thr525Cys. Las cepas portadoras de estos alelos presentan un claro fenotipo de sensibilidad a la LMB en placa. Adicionalmente, se ha demostrado el efecto directo de la LMB en la exportación nuclear mediante la utilización de proteínas quiméricas portadoras de secuencias de exportación nuclear que se ajustan al consenso establecido. En una cepa de *A. nidulans* portadora del alelo *kapK1* la proteína quimérica cNLS::NES::GFP se localiza de forma generalizada entre el núcleo y el citoplasma; sin embargo, en presencia de LMB la proteína queda acumulada en el interior del núcleo, debido al bloqueo de la ruta de exportación nuclear. Este resultado pone de manifiesto de nuevo la elevada conservación que existe entre diferentes organismo en la ruta general de exportación nuclear. Las cepas generadas pueden ser utilizadas para estudiar la dependencia de la ruta de exportación nuclear de proteínas que son excluidas del núcleo. Haciendo uso de ellas se ha logrado identificar una carga natural de KapK, el factor de transcripción NirA (ver apartado 3).

2. Localización de la Exportina-1 en *A. nidulans*.

De acuerdo con su función como exportadores, las exportinas de *S. cerevisiae* y *H. sapiens* presentan localizaciones subcelulares asociadas al núcleo. En el caso de Crm1p de *S. cerevisiae* su localización es mayoritariamente nuclear¹⁰², mientras que en *H. sapiens* CRM1 se concentra en la envoltura nuclear y en el nucleoplasma⁷⁹. En este trabajo se ha demostrado que la localización de KapK es muy parecida a la encontrada en sus homólogos. Aunque existe una clara acumulación de la proteína en el nucleoplasma, también es posible distinguir pequeñas acumulaciones de la proteína en lo que parece la periferia del núcleo. Como se ha mencionado anteriormente, los exportadores se unen a la carga que van a transportar al citoplasma en el interior del núcleo, por tanto, la preferente localización nuclear de KapK estaría de acuerdo con su papel como exportador. La escasa fluorescencia citoplásmica observada concuerda con el modelo de exportación propuesto según el cual la liberación de la carga se produciría en la cara citoplásmica del poro nuclear, sin que la exportina llegue a salir al citoplasma⁷⁸. En este modelo se propone también un importante papel de las nucleoporinas en el proceso de liberación de la carga mediante su asociación con el transportador. De acuerdo con esto, la asociación de las exportinas con proteínas del poro nuclear está ampliamente demostrada. En *H. sapiens* existen varios casos en los que se ha demostrado la interacción de CRM1 con proteínas del NPC así como la implicación de estas nucleoporinas en el proceso de exportación nuclear^{103,104} (ver apartado 4). En el caso de *S. cerevisiae*, son muchas las nucleoporinas identificadas como interactores de Crm1p mediante experimentos de doble híbrido o cromatografía de afinidad. Los homólogos de algunas de estas proteínas, como Nup82p, Nup57p, Nup42p, Nup49p, Nup159p y Nsp1p, han sido identificados en *A. nidulans* y todas ellas se localizan en el canal o en la cara citoplásmica del poro nuclear, donde se produciría la liberación de la carga¹⁰⁵. La interacción de KapK con proteínas del NPC en *A. nidulans* ha sido demostrada en este trabajo (ver más adelante), lo que indicaría que el mecanismo de exportación es similar al propuesto en otros organismos y demostraría que la localización de KapK en pequeñas acumulaciones situadas en la periferia del núcleo se debe a su asociación con proteínas del NPC, seguramente durante el proceso de exportación nuclear de las cargas.

La división nuclear en *A. nidulans* conlleva la desorganización parcial del poro nuclear. El Dr. Stephen Osmani ha estudiado ampliamente los cambios que se producen

en este complejo multiproteico, llegando a la conclusión de que muchas de las nucleoporinas pierden su localización perinuclear durante la mitosis, si bien algunas de ellas permanecen invariables ¹⁰⁵. Otra de las proteínas que cambia de localización cuando la célula entra en mitosis es RanGAP. Durante la interfase RanGAP se localiza en el citoplasma donde estimula la actividad GTPasa de Ran para convertir RanGTP en RanGDP. De esta forma contribuye a que se mantenga el gradiente de Ran necesario para los procesos de transporte núcleo-citoplásmico. Sin embargo, cuando la célula entra en mitosis una parte de RanGAP entra al interior del núcleo, distribuyéndose de forma generalizada por toda la hifa ⁵⁴. Esto implica la pérdida del gradiente de Ran y, por tanto, la pérdida de los procesos de transporte activo. Qué ocurre con los transportadores durante este proceso era algo desconocido hasta el desarrollo de esta tesis doctoral. Si los procesos de transporte están alterados durante la mitosis era de esperar que la localización de los transportadores en la célula también experimentara algún cambio. Efectivamente, el análisis de la localización subcelular de KapK::GFP durante la mitosis ha puesto de manifiesto que una gran parte de KapK abandona el núcleo durante el proceso de división nuclear, sin embargo, existe un remanente de proteína que permanece en el núcleo durante todo el proceso. La desorganización parcial del poro nuclear que se produce durante la mitosis permite el paso de proteínas del citoplasma al núcleo que deben ser excluidas de nuevo al citoplasma una vez finalizada la división nuclear ¹⁰⁵. La presencia de KapK dentro del núcleo podría contribuir a que se produjera una rápida recuperación de los diferentes sistemas o rutas de transporte, exportando al citoplasma todos aquellos elementos que no deben estar en el interior del núcleo, como por ejemplo RanGAP.

La localización nuclear de KapK durante la mitosis también puede ser debida a que esta proteína desempeñe funciones diferentes a las de un mero transportador durante el proceso de división nuclear. En el caso de CRM1 este otro tipo de funciones ya han sido demostradas. Por un lado, CRM1 aparece asociada a los cinetocoros, estructuras situadas cerca de los centrómeros de los cromosomas mitóticos ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Por otro lado, se ha demostrado que CRM1 se localiza en los centrosomas, el principal organizador de microtúbulos durante la mitosis ¹⁰⁹. Por tanto, su papel en la segregación de los cromosomas parece evidente. Algo parecido podría ocurrir en KapK y ello contribuiría a explicar que tras la primera mitosis no se sigan produciendo divisiones nucleares en la cepa portadora del alelo nulo de *kapK*.

3. NirA es una carga natural de KapK.

Los factores de transcripción son los candidatos ideales a ser cargas tanto de importadores como de exportadores. En respuesta a una señal, un determinado factor de transcripción (FT) debe entrar al núcleo para activar o reprimir determinados genes, y una vez cumplida su función, o en respuesta a otra señal, debe salir de nuevo al citoplasma. Un buen ejemplo de este tipo de proteínas es el FT NirA, el activador específico de la ruta de asimilación del nitrato. La entrada al núcleo de NirA está inducida por la presencia de nitrato intracelular, lo cual depende de la funcionalidad del factor AreA, que media la regulación del nitrógeno, y del transportador de nitrato CrnA⁹⁴. La ruta de importación nuclear implicada no ha sido aún identificada. Dada la presencia de grupos de residuos básicos en NirA, cuya estructura primaria es similar a las señales nucleares clásicas, se podría pensar en el heterodímero Importina α /Importina β como el posible importador de este factor transcripcional. Sin embargo, no se ha obtenido ninguna evidencia de interacción mediante experimentos de doble híbrido entre KapA (el homólogo de la Importina α en *A. nidulans*) y NirA, lo que sugiere que debe ser otro importador el encargado de transportar a NirA al interior del núcleo. La ruta de exportación nuclear ha sido identificada en este trabajo. Haciendo uso de las cepas portadoras del alelo de *kapK* sensible a LMB, se ha demostrado que la salida del núcleo de NirA es dependiente de la ruta general de exportación nuclear mediada por KapK.

Los experimentos realizados con fuentes de nitrógeno no inductoras y no represoras sugieren que la NLS de NirA permanece siempre activa mientras que es la NES la que debe ser activada o inactivada por la presencia de amonio o de inductor (nitrato), respectivamente. Adicionalmente, la patente exclusión nuclear de NirA en ausencia de nitrato, que contrasta con la localización subcelular de la proteína quimérica cNLS::NES::GFP, refuerza la hipótesis de la existencia de un mecanismo regulador para la salida/entrada de NirA del núcleo que en este caso favorece notablemente la exclusión nuclear de la proteína. De esta forma, en presencia de una fuente de nitrógeno represora (amonio) la NES de NirA estaría activada por lo que predominarían los procesos de exportación y NirA quedaría excluido del núcleo (Fig. I.20A). En presencia de nitrato (inductor) la NES se desactivaría por lo que NirA quedaría acumulado en el interior del núcleo (Fig. I.20B). Cuando no existe regulación en ninguno de los sistemas de transporte, como ocurre en la proteína quimérica cNLS::NES::GFP, se observa una

localización subcelular generalizada, siendo imposible distinguir núcleos vacíos o llenos (Fig. I.20C).

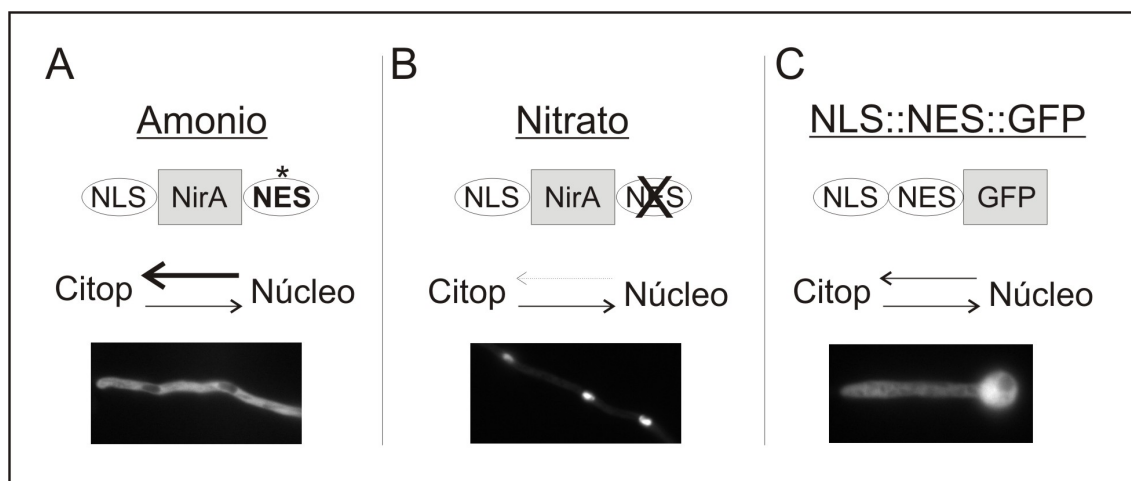


Figura I.20: La localización subcelular de NirA depende de la activación o inactivación de su NES. **A)** En presencia de amonio la NES de NirA estaría activada lo que provocaría la exclusión nuclear de la proteína. **B)** El nitrato desactiva la NES de NirA por lo que sólo funcionaría el mecanismo de importación, como consecuencia de lo cual la proteína se acumula en el núcleo. **C)** Sistema en el cual no predomina ninguna de las dos rutas, ni la de importación ni la de exportación nuclear, lo que provoca una distribución homogénea de la proteína quimérica por toda la hifa.

El trabajo realizado ha permitido detectar la existencia de una putativa secuencia de exportación nuclear en PacC, el factor de transcripción que media la regulación por pH. Sin embargo, no se ha observado interacción entre KapK y PacC en ensayos de doble híbrido. Esto indica que la presencia de residuos conservados Leu/Ile ajustándose al consenso establecido no es suficiente para constituir una NES que sea reconocida por KapK. Se ha sugerido que es necesaria una carga neta negativa para que la NES sea funcional¹¹⁰ y de acuerdo con esta observación, la NES de PacC carece de residuos ácidos. Aunque la NES de NirA sí parece ser reconocida por KapK, falta por ser determinada la base molecular que debe regular la función de la NES. Para otros factores transcripcionales se ha demostrado que diferentes mecanismos están implicados en la regulación de estas señales. Por ejemplo, la fosforilación de la NES de la proteína “Snail” o de p27^{111,112} provoca la activación de la misma, siendo reconocida por la Exportina-1. Por el contrario, la fosforilación de la NES de NFAT1, mPER o p53 causa su inactivación¹¹³⁻¹¹⁵. En otros casos se producen mayores modificaciones como cambios conformacionales de la proteína para mostrar u ocultar las señales de transporte nuclear. Así, un cambio de conformación del factor transcripcional Yap1 provoca la ocultación de la NES, quedando retenido en el núcleo^{116,117}. En el caso de PacC, la

señal bipartita reconocida por la Importina α , NLS2, permanece oculta hasta que se produce el procesamiento proteolítico de la proteína ⁶⁶. Trabajos futuros de mutagénesis dirigida de la NES no funcional de PacC y aislamiento de mutaciones en la NES de NirA proporcionarán datos a cerca del reconocimiento y unión específica de KapK a estas secuencias así como del mecanismo que regula la exportación e importación de NirA.

4. La nucleoporina NplA.

Como se ha mencionado en el apartado 2 las nucleoporinas juegan un papel muy importante en el proceso de liberación de la carga y su interacción con los transportadores ha sido demostrada tanto en *S. cerevisiae* como en *H. sapiens* ^{79,96,99,103,104}. El trabajo entorno a NirA ha permitido identificar una proteína del poro nuclear que parece estar involucrada en el proceso de exclusión de NirA del núcleo. Esta proteína, denominada NplA, ha sido caracterizada como una nucleoporina por presentar en su secuencia múltiples repeticiones FG. Se ha demostrado que NplA interacciona tanto con el elemento que va a ser exportado del núcleo, NirA, como con su exportador, KapK, lo que indica la implicación de los tres elementos en la misma ruta. En la interacción entre nucleoporinas y exportinas están implicadas la región CRIME de la exportina, lo que concuerda con los resultados obtenidos mediante doble híbrido; y la región rica en repeticiones FG de la nucleoporina, si bien pueden verse implicadas otras regiones de la nucleoporina ¹¹⁸⁻¹²³. Este parece ser el caso de la interacción entre KapK y NplA ya que los experimentos de doble híbrido revelan la existencia de interacciones tanto con la región rica en repeticiones FG como con el extremo más amino-terminal de NplA. Esto estaría de acuerdo con el modelo propuesto en diferentes trabajos ¹²⁴⁻¹²⁶ en los cuales se sugiere que la exportina interacciona con la nucleoporina en diferentes puntos siendo mayor su afinidad por regiones de la nucleoporina situadas hacia el lado citoplásmico del poro nuclear. De esta manera se produciría un direccionamiento de la carga transportada del núcleo al citoplasma.

Uno de los sistemas mejor caracterizados es la exportación nuclear de la proteína Rev del virus HIV-1. En el modelo de exportación nuclear propuesto para explicar la salida del núcleo de la proteína Rev están implicadas proteínas del poro nuclear ^{96,99}. Según este modelo el complejo formado por Rev/Crm1/RanGTP interaccionaría con la nucleoporina Rip1, un homólogo de Nup42p, en el NPC. Esta interacción produciría la liberación de Rev y la formación de un complejo Crm1/RanGTP/Rip1 que sería

posteriormente desensamblado gracias a la participación de proteínas capaces de interaccionar con Ran. Basándonos en estos trabajos podríamos proponer un modelo de la ruta de exportación nuclear de NirA (Fig. I.21). El primer paso sería la unión de NirA a la exportina, lo cual implicaría la formación del complejo NirA/KapK/RanGTP. Una vez en el poro nuclear se produciría la interacción con NplA, produciéndose la liberación de NirA y la formación del complejo KapK/RanGTP/NplA. Dada la demostrada interacción entre NirA y NplA no se puede descartar la formación del complejo cuaternario NirA/KapK/RanGTP/NplA si bien la estabilidad del mismo sería muy reducida puesto que, como se ha mencionado anteriormente, la interacción con la nucleoporina promovería la liberación de NirA. La liberación del complejo KapK/RanGTP/NplA implicaría la participación de proteínas que interaccionan con Ran así como de RanGAP, quedando la exportina libre para un nuevo ciclo de exportación nuclear. Teniendo en cuenta que el alelo nulo de *nplA* no afecta a la exportación de NirA, deben existir rutas alternativas de transporte en la salida del núcleo de este factor de transcripción que no impliquen a NplA

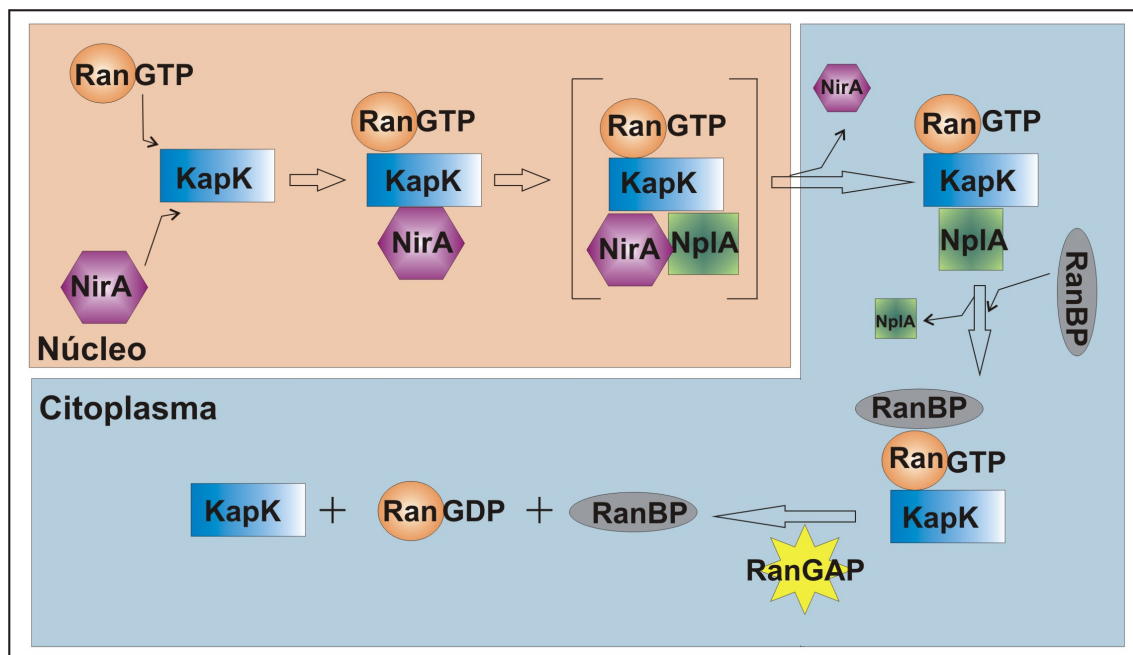


Figura I.21: Modelo propuesto para la exportación nuclear de NirA. La unión de RanGTP a KapK permitiría la unión de NirA, generándose un complejo heterotrimérico capaz de interaccionar con la nucleoporina NplA. Los resultados de interacción *in vitro* en los que se detecta la interacción entre NirA y NplA no permiten descartar la formación de un complejo cuaternario formado por Ran/NirA/KapK/NplA. La interacción con las proteínas del poro nuclear llevaría a la liberación de NirA hacia el lado citoplásmico. La interacción de proteínas que interaccionan con Ran (RanBP) así como de RanGAP conduciría al desensamblaje del complejo, quedando KapK libre para un nuevo ciclo de exportación nuclear.

La proteína de *S. cerevisiae* más parecida a NplA es Nup42p si bien entre ellas existen importantes diferencias. En la estructura primaria de NplA se puede distinguir una región N-terminal que no existe en Nup42p. En esta región se localiza un dedo de zinc del tipo C-x8-C-x5-C-x3-H y una putativa región “coiled-coil”. Entre las proteínas que contienen dedos de zinc del tipo CCCH se encuentran muchas proteínas eucariotas implicadas en ciclo celular y algunas de ellas son capaces de interactuar a través de este motivo con la región 3'UTR de determinados mRNAs^{127,128}. Este podría ser el caso del dedo de zinc de NplA de forma que, al ser separado del resto de la proteína, ayudara a la exportación de mRNAs o contribuyera a aumentar su estabilidad.

El alelo nulo de *nplA* causa un grave defecto de crecimiento a 42°C así como una acumulación de KapK en el interior del núcleo, lo que indica que los procesos de transporte nucleocitoplásmico en una cepa *ΔnplA* no se producen con normalidad, al menos a 42°C. Al igual que el nulo, las versiones truncadas de NplA también causan serios defectos de crecimiento a 42°C. Esto sugiere que las regiones presentes en NplA que la diferencian de Nup42p deben desempeñar una función importante para la célula, al menos en condiciones de estrés por elevación de la temperatura. De acuerdo con esta observación, se ha demostrado que el homólogo de NplA en humanos, NPL1, está implicado en la exportación del mRNA de la “Heat Shock Protein” Hsp70¹²⁹ lo que constituye una prueba de la implicación de este tipo de nucleoporinas en procesos de respuesta a estrés por calor.

El estudio de la localización subcelular de NplA ha puesto de manifiesto que esta proteína es procesada generando dos fragmentos detectables en la célula. Una de estas partes es similar a Nup42p de *S. cerevisiae* y como tal se localiza mayoritariamente en la periferia del poro nuclear, la otra, que correspondería al extremo amino-terminal de la proteína, aparece distribuida por toda la hifa. El procesamiento proteolítico de algunas nucleoporinas ha sido observado anteriormente¹³⁰. En *A. nidulans* la nucleoporina SonB es procesada en dos proteínas diferentes, SonB^{NUP98} y SonB^{NUP96}¹³¹ al igual que sus homólogos en vertebrados Nup98 y Nup96, que se generan por el procesamiento proteolítico de un precursor común¹³². En *S. cerevisiae*, también se ha observado procesamiento en la nucleoporina Nup145p¹³³. En todos estos ejemplos se produce un auto-procesamiento de la proteína, sin embargo, nuestros resultados de expresión *in vitro* parecen indicar que el caso de NplA es diferente y en lugar de existir auto-procesamiento, podría ser otra proteína la encargada de realizar la proteólisis. Teniendo en cuenta la elevada conservación de la región C-terminal de

NplA así como la falta de procesamiento observada en una cepa que expresa la proteína NplA::mRFP, es posible especular que la proteína encargada de llevar a cabo el procesamiento proteolítico de NplA fuera reclutada por esta región C-terminal para realizar el corte de NplA. Según el modelo propuesto por el Dr. Stephen Osmani NplA se sitúa en las proximidades de SonB por lo que una posibilidad sería que esta misma nucleoporina fuera la encargada de procesar a NplA.

En conclusión, el trabajo realizado entorno a los sistemas de exportación nuclear en *A. nidulans* ha permitido identificar y caracterizar la ruta de exportación mediada por el homólogo de CRM1. La generación de un mutante condicional de KapK es una herramienta muy útil para estudiar los sistemas de transporte en los que esté implicado este transportador, dada la esencialidad de la proteína, y permitirá descubrir nuevas proteínas que sean transportadas del núcleo al citoplasma por esta ruta. Utilizando el mismo abordaje el grupo del Dr. Michael Hynes ha estudiado la ruta de exportación del factor AreA¹³⁴. Además del transportador KapK se ha identificado una carga natural del mismo, NirA; así como una proteína del poro nuclear implicada en esta ruta, NplA. La notable diferencia existente entre NplA y Nup42p así como el hecho de que NplA sea procesada en dos partes claramente diferentes sugiere que esta proteína desempeña funciones que van más allá de las meramente estructurales formando parte del NPC. Se abre así una nueva línea de trabajo con el fin de determinar cuál o cuáles pueden ser estas funciones y su relación con las rutas de exportación nuclear.

Estudio de la ruta general de importación nuclear en *Aspergillus nidulans*

PARTE II

INTRODUCCIÓN.

Las proteínas que deben ser transportadas del citoplasma al interior del núcleo contienen señales que las identifican como sustratos de las proteínas transportadoras. Estas señales se denominan señales de localización nuclear (NLS) y, generalmente, están compuestas por uno o más grupos de residuos básicos. Las NLSs más abundantes y mejor caracterizadas experimentalmente son las denominadas NLSs clásicas¹³, las cuales son reconocidas específicamente por el importador nuclear Importina α . Las NLSs clásicas están formadas por grupos de residuos de carácter básico como lisinas y argininas. Existen dos clases de NLSs clásicas: las monopartitas y las bipartitas. La primera NLS fue identificada en el antígeno T grande del virus SV40 (₁₂₆PKKKRKV₁₃₂) y constituye el prototipo de NLS clásica monopartita¹³⁵. La secuencia consenso de las señales monopartitas clásicas ha sido ampliada mediante el estudio de otras señales, estableciéndose el requisito de ser un grupo de más de tres residuos básicos (lisinas y argininas), precedidos de una prolina y flanqueados por residuos ácidos y neutros¹³. Las NLSs clásicas bipartitas, cuyo prototipo es la señal bipartita de la nucleoplasmina (₁₅₀KRPAAIKKAGQAKKK₁₇₀)¹³⁶, están formadas por dos grupos de residuos de lisinas y argininas, generalmente siguiendo la disposición: KR-X(10-12)-KRRK¹³⁷.

Sin embargo, hay excepciones a estas reglas; un tipo peculiar de NLS clásica fue descrita en el factor de transcripción PrnA de *A. nidulans*¹³⁸, el cual posee una NLS tripartita, compuesta por tres grupos de residuos básicos, el último de los cuales forma a su vez parte del dominio “binuclear Zn cluster” de unión a DNA. También se han descrito otros tipos de NLSs cuyas estructuras primarias no se ajustan a las secuencias consenso definidas para las NLSs clásicas. Este es el caso de la NLS de la proteína M9 que está formada por una región de 38 aminoácidos rica en residuos de glicina¹³⁹. En la chaperona de RNA Lhp1p la NLS ocupa una región extensa de la proteína por lo que ésta debe adoptar una determinada estructura terciaria para que la NLS pueda ser reconocida¹⁴⁰.

Las proteínas que contienen una NLS clásica son transportadas al núcleo interaccionando con el heterodímero Importina α /Importina β 1. La Importina β 1 es el verdadero transportador en este complejo y, aunque puede reconocer cargas directamente, en muchos casos necesita de un adaptador. Así, se han caracterizado dos adaptadores en los diferentes organismos eucariotas analizados: la Snurportina¹⁴¹, que

media el transporte de ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snRNPs); y la Importina α ¹⁴² que interacciona con proteínas portadoras de NLSs clásicas.

La Importina $\beta 1$ es la proteína mejor caracterizada de la superfamilia de proteínas implicadas en transporte nuclear, a la cuál da nombre. Los diferentes miembros de la superfamilia “Importina $\beta 1$ -like” contienen una región N-terminal capaz de interaccionar con RanGTP y varias repeticiones HEAT donde determinados residuos son capaces de interaccionar con proteínas del NPC y en el caso específico de la Importina $\beta 1$, con la Importina α . El motivo HEAT consta de aproximadamente 40 aminoácidos y está presente en una gran variedad de proteínas eucariotas¹⁴³ (ver introducción de la Parte I para más detalle). En algunas de las repeticiones, los residuos que mantienen unidas las dos hélices tienen naturaleza hidrófoba y están implicados en el reconocimiento de la Importina α . En el caso de la Importina $\beta 1$ de humanos el lazo de residuos ácidos que une las dos hélices de la repetición HEAT 8 está implicado en el reconocimiento del IBB de la Importina α y contiene un residuo de triptófano que contribuye a aumentar la estabilidad del heterocomplejo Importina $\alpha/\beta 1$ ¹⁴⁴.

En la Importina α se pueden distinguir dos grandes regiones funcionales: un dominio N-terminal de unión a Importina β (IBB) y varios dominios Armadillo que ocupan el resto de la proteína. El dominio IBB está formado por residuos de carácter básico y adopta una estructura de hélice α . El IBB está unido al resto de la proteína por una serie de aminoácidos que carecen de una estructura determinada formando así un codo flexible. Ciertos residuos básicos dentro del IBB conforman el dominio autoinhibitorio, denominado así porque es capaz de interaccionar *en cis* con los sitios de unión a NLSs de la propia Importina α cuando no interacciona *en trans* con la Importina $\beta 1$. La concentración de residuos básicos en el dominio IBB, característicos de las NLSs clásicas, y su afinidad por interaccionar con sitios que unen NLSs estaría de acuerdo con la hipótesis de que originalmente el IBB constituiría la NLS de una Importina α ancestral, la cual sería una carga, y no un adaptador, de la Importina $\beta 1$ ¹⁴⁵. El resto de la proteína está formada por diez repeticiones del dominio armadillo (ARM. Dominios definidos en la proteína Armadillo de *Drosophila melanogaster*¹⁴⁶). En el último dominio se encuentra la región que es reconocida por el exportador CAS/Cse1p que media la salida del núcleo de la Importina α . La estructura terciaria de las repeticiones ARM de la Importina α y de las repeticiones HEAT de la Importina $\beta 1$ son muy similares, habiéndose propuesto un origen evolutivo^{80,146}(Fig. II.1).

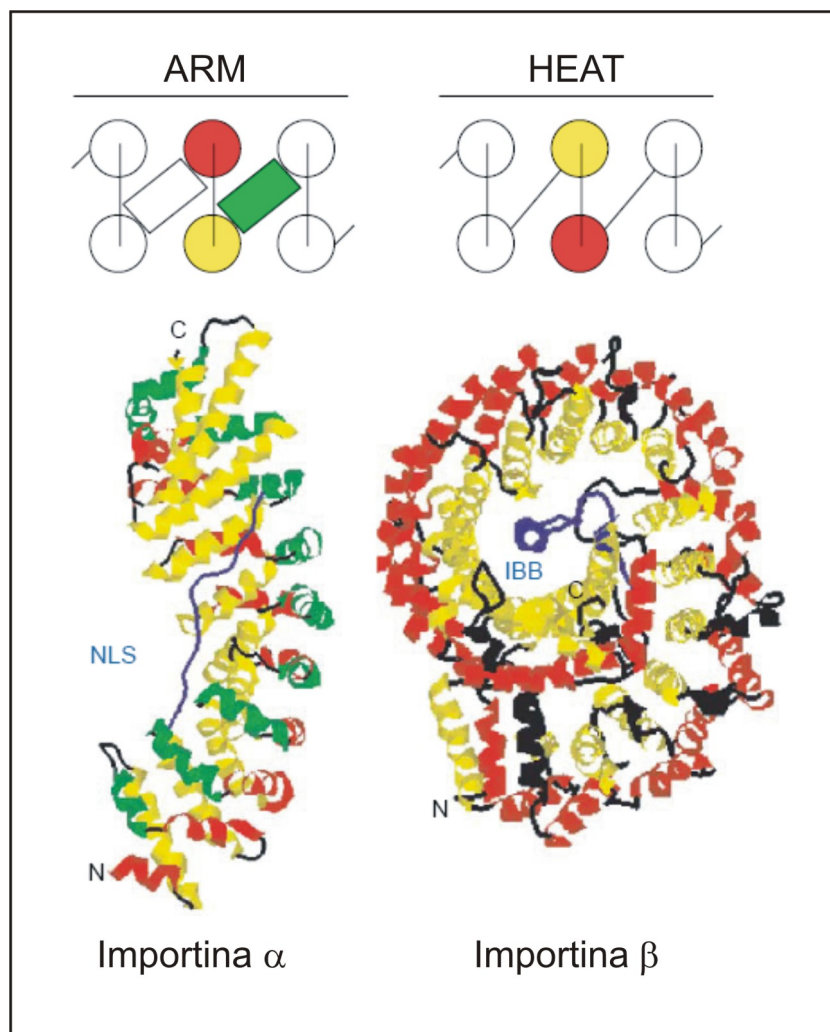


Figura II.1: Estructura terciaria de la Importina α y la Importina β 1. Comparación de la arquitectura de hélices α (cilindros) de los dominios armadillo (ARM) y los dominios HEAT (HEAT) y su disposición en la estructura tridimensional de una Importina α y una Importina β 1. En la parte superior de la figura las hélices H1, H2 y H3 de la Importina α se muestran en verde, rojo y amarillo respectivamente; y las hélices A y B de la Importina β aparecen coloreadas de rojo y amarillo, respectivamente. En la parte inferior, en azul se muestra la estructura de una NLS bipartita (NLS) y el dominio de unión a Importina β (IBB) en interacción con las importinas.

Las NLSs interactúan con la Importina α por la superficie interna de la estructura helicoidal que forman las distintas repeticiones armadillo^{147,148}. Esta superficie está formada por los residuos más conservados y se distinguen dos sitios de unión: el sitio de mayor afinidad, formado por los ARM 2 a 4, y el sitio de menor afinidad que comprende los ARM 7 a 8 (Fig. II.2A). Tanto la unión de NLSs monopartitas como bipartitas clásicas se produce a través de múltiples interacciones de tipo electrostático, hidrofóbico y de puentes de hidrógeno entre las cadenas laterales de

los residuos de la cara interna de la Importina α y las cadenas laterales de los residuos de la NLS interactuante.

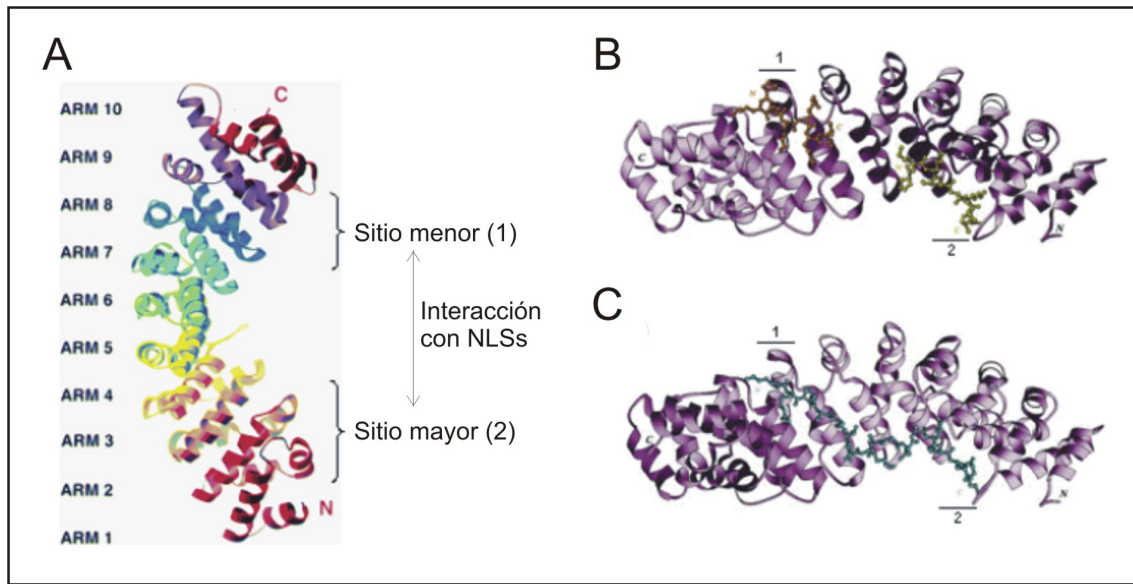


Figura II.2: Interacción entre la Importina α y las NLSs clásicas. **A)** Estructura cristalina de la Importina α de *S. cerevisiae* sin el dominio de unión a Importina β 1 (código de acceso 1bk5). Las distintas repeticiones armadillo aparecen enumeradas y coloreadas en diferentes tonalidades. A la derecha se indica la posición de los sitios menor (1) y mayor (2) de interacción con las NLSs. **B)** Estructura de la Importina α de *Mus musculus* (magenta) interaccionando con dos NLSs monopartitas del virus SV40 (código de acceso 1EJLL). **C)** Estructura de la Importina α de *Mus musculus* (magenta) interaccionando con la NLS bipartita de la nucleoplasmina de *Xenopus laevis* (código de acceso 1EJY).

Las NLSs monopartitas interaccionan principalmente a través del sitio de mayor afinidad, situándose en una estructura secundaria extendida (tipo lámina β) en el eje de la super-hélice de manera antiparalela a la cadena de la importina (Fig. II.2B). La unión consta de tres componentes: i) las interacciones del esqueleto de la NLS con las asparaginas conservadas, que marcan la dirección de la NLS; ii) las porciones alifáticas de las cadenas laterales de lisinas que se hunden en sitios hidrofóbicos; iii) los puentes de hidrógeno que establecen las cadenas laterales de lisina con los residuos cargados negativamente que tapizan los surcos hidrofóbicos.

En el caso de las NLSs bipartitas la unión se produce a través de los dos sitios de interacción de la Importina α (Fig. II.2C). De igual manera que las NLSs monopartitas, el péptido de NLS se sitúa antiparalelo a lo largo del eje de la super-hélice: el primer grupo de residuos básicos de la NLS interacciona con el sitio de menor afinidad de la importina y el segundo grupo con el sitio mayor. Los residuos situados entre ambos grupos de residuos básicos se sitúan extendidos y establecen diversos contactos con la

super-hélice interna de la importina ayudando así a la correcta disposición de los residuos básicos en los sitios de unión.

Una vez que el heterocomplejo Importina $\beta 1/\alpha$ /carga pasa al interior del núcleo, la liberación de la carga es promovida por la unión de RanGTP a la Importina $\beta 1$. Esta unión provoca un cambio de conformación en la Importina $\beta 1$ que disminuye su afinidad de interacción con el IBB de la Importina α . Al soltarse el IBB de la Importina $\beta 1$ desplaza a la carga que, a través de su NLS, está unida a los sitios de unión a NLSs de la Importina α , quedando así libre en el nucleoplasma. Existen otros factores que promueven la liberación de la carga, como la nucleoporina Nup2p cuya región N-terminal tiene afinidad por los sitios de unión a NLSs por lo que compite con la carga por la unión a la Importina α ¹⁴⁹.

En este trabajo se han identificado los homólogos del heterocomplejo Importina $\alpha/\beta 1$ en *A. nidulans*, KapA y KapB, respectivamente. En *Aspergillus nidulans* no existe un posible homólogo de la Snurportina, por lo tanto, KapB, en principio, cuenta con un solo adaptador en este organismo. El estudio de la localización subcelular de ambos factores ha puesto de manifiesto que el citoesqueleto juega un importante papel en los procesos de transporte. Se ha generado un mutante termosensible de la Importina α y se han identificado varias proteínas capaces de interaccionar con ella. Se han identificado proteínas portadoras de NLS monopartitas (NapB) y bipartitas (VeA) y se ha demostrado que KapA es capaz de interaccionar con estas proteínas. La caracterización de NapB, una proteína ensambladora de nucleosomas de la familia Nap/SET, ha llevado a la identificación de un segundo miembro de la familia, NapA, hallándose evidencia de que tanto su transporte nucleocitoplásmico, como su función en *Aspergillus* puede diferir notablemente de lo descrito en otros organismos.

RESULTADOS.

1. Caracterización del heterodímero Importina α /Importina $\beta 1$ en *Aspergillus nidulans*.

El análisis de la ruta general de importación nuclear en *A. nidulans* comenzó con la identificación de las dos proteínas que, formando un heterodímero, son responsables del transporte de un gran número de proteínas al interior del núcleo: la Importina $\beta 1$, el verdadero transportador; y la Importina α . La búsqueda de un homólogo de la

Snurportina fue infructuosa, utilizando tanto el programa Blastp como tBlastn y las bases de datos de proteínas y de DNA de *A. nidulans*, respectivamente. Por lo tanto, la Importina α debe ser el principal adaptador de la Importina $\beta 1$ en este hongo.

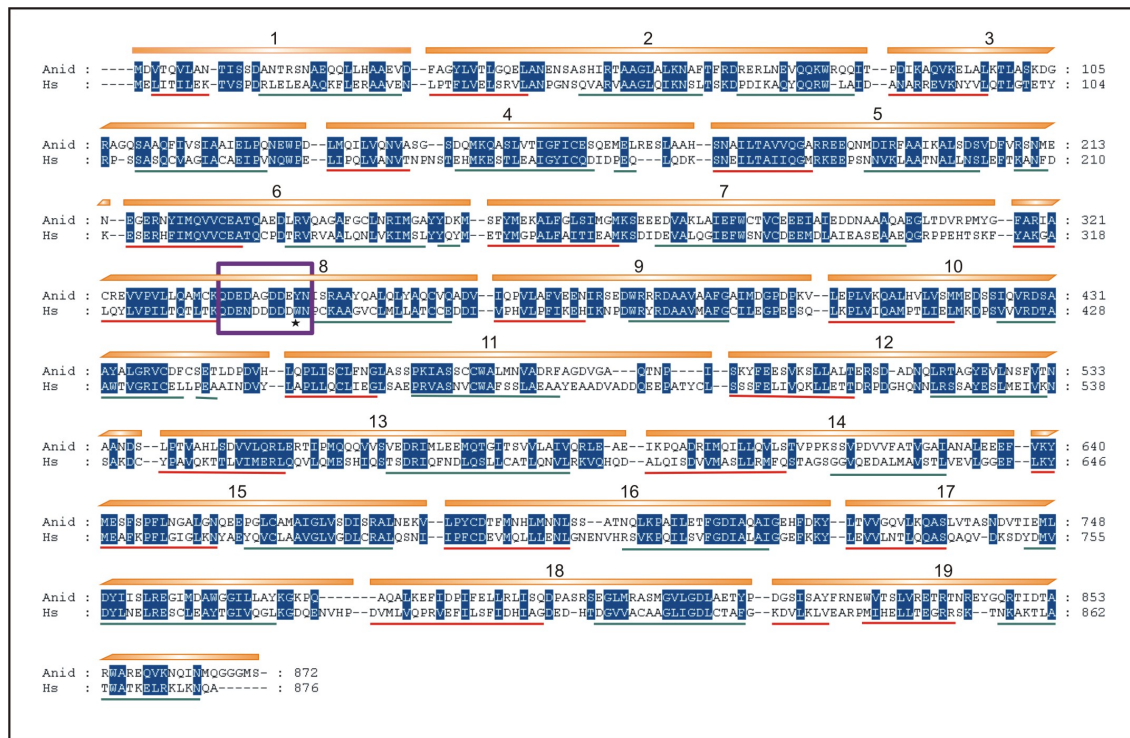


Figura II.3: Comparación de la secuencia de aminoácidos de las Importinas $\beta 1$ de *A. nidulans* y *H. sapiens*. En la secuencia de KapB de *A. nidulans* (Anid) se pueden distinguir las 19 repeticiones HEAT descritas en la Importina $\beta 1$ de *H. sapiens* (Hs). En naranja se muestran cada una de las repeticiones HEAT. Las líneas rojas señalan las hélices A y las líneas verdes las hélices B que forman las distintas repeticiones HEAT en la Importina $\beta 1$ de humanos. Enmarcado en color morado se muestra el lazo de residuos ácidos involucrado en el reconocimiento del dominio IBB de la Importina α ; el asterisco señala la posición del residuo, en la cadena lateral apolar, implicado en aumentar la estabilidad de la estructura, un triptófano en KPNB o una tirosina en KapB.

1.1 Identificación del homólogo de la Importina $\beta 1$ en *A. nidulans*.

Utilizando las secuencias de aminoácidos de Kap95p, el ortólogo de la Importina $\beta 1$ en *S. cerevisiae*, así como de la Importina $\beta 1$ de humanos (KPNB 1), se realizaron búsquedas de similitud de secuencias (tBLASTn) encontrándose un único gen, *AN0906.3*, en el genoma de *A. nidulans* que codificara para una proteína hipotética con un alto nivel de similitud a las utilizadas en las búsquedas. *AN0906.3* se localiza en el cromosoma VIII y se ha denominado *kapB*, por “*k*ariopherin” β *locus B*. La región codificante del gen está dividida en ocho exones cuya traducción conceptual da lugar a una proteína de 873 aminoácidos con un peso molecular estimado de 96,2kDa. La

secuencia de aminoácidos de KapB guarda un 38% de identidad con la secuencia de Kap95p, su ortólogo en *S. cerevisiae*; un 36% con la carioferina $\beta 1$ de humanos y 84%, 63% y 48% de identidad con las putativas importinas $\beta 1$ de *Aspergillus fumigatus*, *Neurospora crassa* y *Schizosaccharomyces pombe*, respectivamente.

Las secuencias de aminoácidos de KapB y de su homólogo en humanos, KPNB, están lo suficientemente conservadas como para poder predecir el patrón de repeticiones HEAT para KapB basándonos en la estructura modelada a partir de los datos del cristal de las repeticiones HEAT de KPNB (Fig. II.3). Al igual que en la Importina $\beta 1$ de humanos, en KapB se podrían distinguir 19 repeticiones HEAT, cada una de las cuales estaría formada por una hélice A y una hélice B, y el lazo de residuos ácidos situado en la HEAT 8 de KPNB e implicado en el reconocimiento del dominio IBB (ver Introducción Parte II para más detalle). Así mismo está conservada la presencia de un residuo hidrofóbico, tirosina 325, en la posición correspondiente al triptófano implicado en aumentar la estabilidad de la estructura. En la región N-terminal de KapB, entre los residuos 21 y 102, se situaría el dominio N-terminal-importina- β (IB_NT), característico de los miembros de esta familia de proteínas, a través del cual se produciría la interacción con la GTPasa Ran.

1.1.1 Análisis del alelo nulo de *kapB*.

La caracterización de la Importina $\beta 1$ de *A. nidulans* se realizó en estrecha colaboración con el laboratorio del Prof. Stephen A. Osmani. Su laboratorio se centró en la construcción del alelo $\Delta kapB$, reemplazando la región codificante del locus *kapB* por el gen *pyrG*^{A.fum}. Al igual que ocurrió con la delección de la Exportina-1, KapK, la ausencia de KapB causó un fenotipo de letalidad en *A. nidulans*. El análisis de los heterocariontes resultantes de la transformación en medio líquido carente de pirimidinas, donde sólo podían crecer aquellos conidios portadores del alelo nulo, reveló la ausencia total de crecimiento polar tras tres días de incubación a 25°C, observándose conidios germinados con notable crecimiento isotrópico, que no habían sido capaces de emitir el tubo hifal germinativo (Fig. II.4). Adicionalmente, se realizó una tinción con DAPI para determinar el estado y número de los núcleos. Como era de esperar debido a la ausencia total de tubo germinativo, en todos los conidios se observó una única acumulación de fluorescencia lo que indicaba que la ausencia de KapB impedía que se produjera la primera mitosis. Además, los núcleos de la cepa $\Delta kapB$

presentaban un aspecto fragmentado, claramente diferente al aspecto íntegro y a la tinción homogénea con DAPI que se observaba en los núcleos de las células de la cepa silvestre (Fig. II.4).

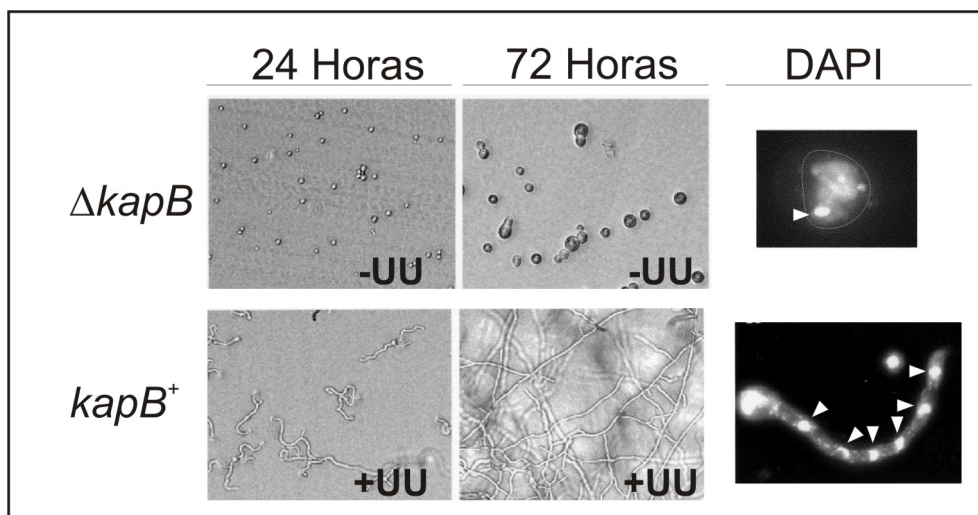


Figura II.4: Fenotipo del alelo $\Delta kapB$. Conidios portadores del alelo nulo de *kapB* fueron incapaces de germinar tras 24 y 72h de incubación en medio mínimo de *Aspergillus* sin suplementar con pirimidinas (-UU). La cepa silvestre, portadora de la mutación *pyrG89*, creció normalmente en un medio suplementado con pirimidinas (+UU). A la derecha se muestra el resultado de la tinción con DAPI. Las puntas de flechas señalan los núcleos en la cepa silvestre y el núcleo fragmentado de la cepa portadora del alelo $\Delta kapB$.

1.2 Identificación del homólogo de la Importina α en *A. nidulans*.

Para identificar el gen que codifica para la Importina α en *A. nidulans* se utilizó la secuencia de aminoácidos de Srp1p, la única Importina α de *S. cerevisiae*, y las de las seis Importinas α de humanos para realizar búsquedas del tipo tBLASTn. Como resultado de estas búsquedas se identificó un único gen en el genoma de *A. nidulans* que codificaba para una proteína similar a la Importina α (AN2142) y que se denominó *kapA* (por “kariopherin” α , locus A). Adicionalmente se verificó que KapA era la única proteína en la base de datos de proteínas de *A. nidulans* que contenía los dos dominios característicos de las importinas α , el dominio de unión a Importina β (IBB) y el dominio armadillo (ARM). Sin embargo, se detectó otra proteína con dominios armadillo, el putativo ortólogo de la proteína vacuolar Vac8p de *S. cerevisiae*. La caracterización de las versiones genómica y cDNA de *kapA* reveló que la secuencia codificante de este gen, situado en el cromosoma VII, está dividida en tres exones cuya traducción conceptual daría lugar a una proteína de 553 aminoácidos con un peso molecular estimado de 60,6kDa. Esta proteína, KapA, guarda un 57% de similitud en su

secuencia de aminoácidos con Srp1p de *S. cerevisiae*, 85% y 95% de similitud con las hipotéticas Importinas α de *Aspergillus fumigatus* y *Neurospora crassa*, respectivamente, 61% y 68% de similitud con las dos Importinas α de *Schizosaccharomyces pombe* y un rango de 46-58% de similitud con las seis Importinas α presentes en el genoma humano.

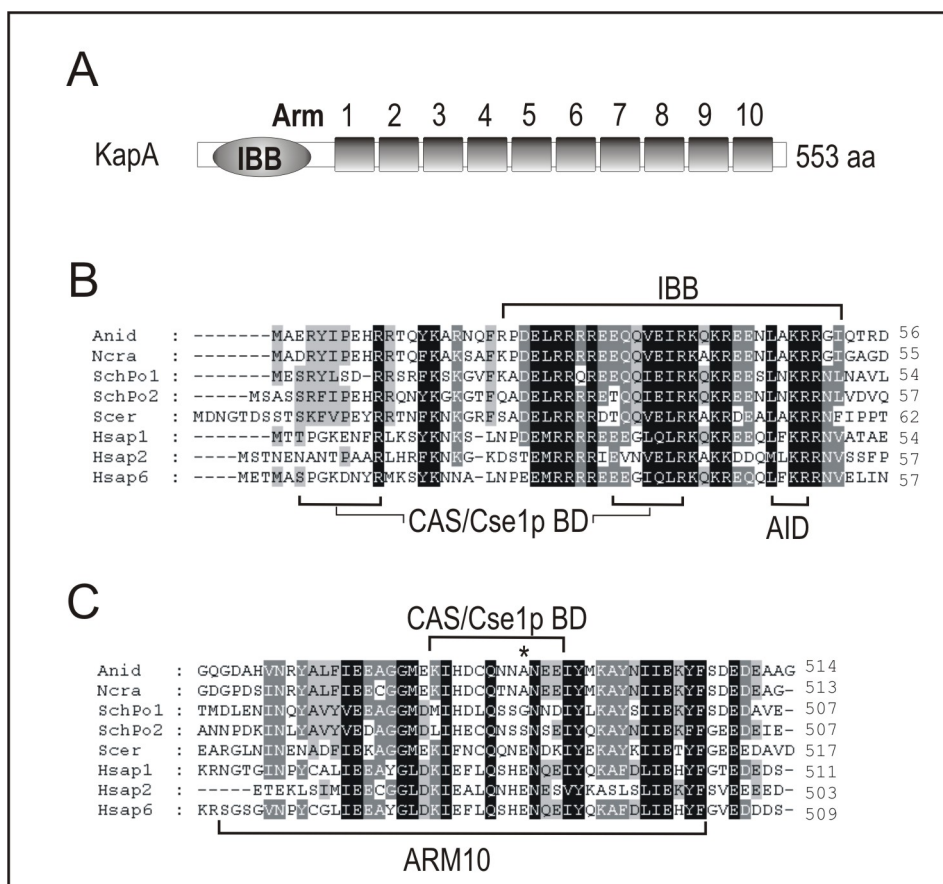


Figura II.5: Caracterización de KapA, la Importina α de *A. nidulans*. **A)** Representación esquemática mostrando la posición relativa del dominio de unión a Importina β (IBB) y las 10 repeticiones Armadillo (Arm) de KapA. **B)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del dominio IBB de las siguientes Importinas α : Anid, KapA (GenBank AAL69976; Hsap 1, 2 y 6 corresponden a las proteínas de *Homo sapiens* KPN1 (GeneBank AAH02374), KPN2 (GeneBank AAH05978) y KPN6 (GeneBank AAH20520); Ncra, Importina α de *Neurospora crassa* (GeneBank CAC28642); SchPo1 y SchPo2, Importina α 1 y α 2 de *Schizosaccharomyces pombe* (GeneBank CAA22341 y BAA24518, respectivamente); Scer, Srp1p de *Saccharomyces cerevisiae* (GeneBank AAA35090). **C)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del Armadillo 10 de las proteínas mostradas en el panel B. Los residuos totalmente conservados (según BLOSUM62) están sombreados en negro. Los residuos sombreados de gris oscuro y gris claro están conservados un 80% y un 60%, respectivamente. En los paneles **B** y **C**, CAS/Cse1 BD marca los putativos sitios de unión reconocidos por el exportador específico de la Importina α situados en el IBB y en el Armadillo 10. El asterisco indica la posición de un residuo ácido que en la Importina 2 humana es necesario para que se produzca la interacción con CAS/Cse1 pero que no está conservado en KapA.

En la estructura primaria de KapA se pueden distinguir todos los dominios descritos en este tipo de proteínas: un dominio N-terminal de interacción con la Importina β 1 (IBB), en cuyo interior se localizan los residuos que forman el dominio autoinhibitorio (AID); y diez repeticiones del dominio Armadillo (ARM) distribuidas a lo largo de la proteína (Fig. II.5A). El dominio IBB está altamente conservado, conteniendo residuos implicados en la interacción de la Importina α con las repeticiones HEAT de la Importina β ^{150,151} lo que sugiere que la interacción entre KapA y KapB se debe llevar a cabo por mecanismos intermoleculares similares (ver Introducción Parte II para más detalle). En el dominio IBB y en el Armadillo 10 se localizan varios grupos de residuos que son reconocidos por el exportador específico de la importina α , CAS/Cse1p (Fig. II.5B y C)¹⁵². Los dos grupos de residuos situados en el IBB están altamente conservados en KapA; sin embargo, en el Armadillo 10, KapA carece de un residuo ácido (señalado con un asterisco en la Fig. II.5C) cuya implicación en la interacción con CAS ha sido demostrada en humanos¹⁵². Esta observación invita a pensar que la interacción entre KapA y el homólogo de CAS/Cse1p en *A. nidulans* (KapE/AN6591.3) podría ocurrir a través de un mecanismo diferente.

1.2.1 Generación y análisis del alelo nulo de *kapA*.

El alelo nulo de *kapA* se construyó mediante reemplazamiento génico de la secuencia codificante empleando un fragmento de DNA, obtenido por técnicas de PCR, que contenía el gen *pyrG* de *A. fumigatus* flanqueado por el promotor y el terminador del gen *kapA*. Al transformar la cepa MAD1425 de *A. nidulans* auxótrofa para pirimidinas, portadora del alelo de pérdida de función *pyrG89*, con este fragmento puede tener lugar un proceso de doble recombinación que conduce al reemplazamiento de la secuencia codificante de KapA por el marcador de selección, en este caso el gen *pyrG* de *A. fumigatus*. Los transformantes obtenidos mostraron un claro fenotipo heterocariótico y sus conidios fueron incapaces de crecer en medio sin pirimidinas lo que indicaba que *kapA* es esencial para *A. nidulans* (Fig. II.6A). La heterocariosis fue confirmada mediante técnicas de PCR con oligonucleótidos externos a la construcción, *imp7* e *imp8* (tabla 2), utilizando el DNA genómico de los transformantes como molde. Con esta pareja de oligonucleótidos se esperaba amplificar una banda de 5,2kb procedente del DNA del núcleo silvestre y una de 5,1kb procedente del DNA del núcleo transformado. Dada la igualdad de tamaños, se digirieron los productos de PCR con la

enzima de restricción *ClaI* de modo que la banda “silvestre” de 5,2kb se dividía en tres bandas de 3,17, 1,5 y 0,5kb; y la banda de 5,1kb procedente de la amplificación del *locus* mutante *kapA* del núcleo $\Delta kapA$ se dividía en dos bandas de 4,6 y 0,5kb. La digestión del producto de la PCR realizada sobre el DNA de la cepa no transformada dio lugar a tres bandas mientras que el producto de PCR procedente de la cepa heterocariote se digirió en cinco bandas, dos de ellas de 0,5kb por lo que en el gel sólo es posible visualizar cuatro bandas, confirmándose así la heterocariosis (Figura II.6B).

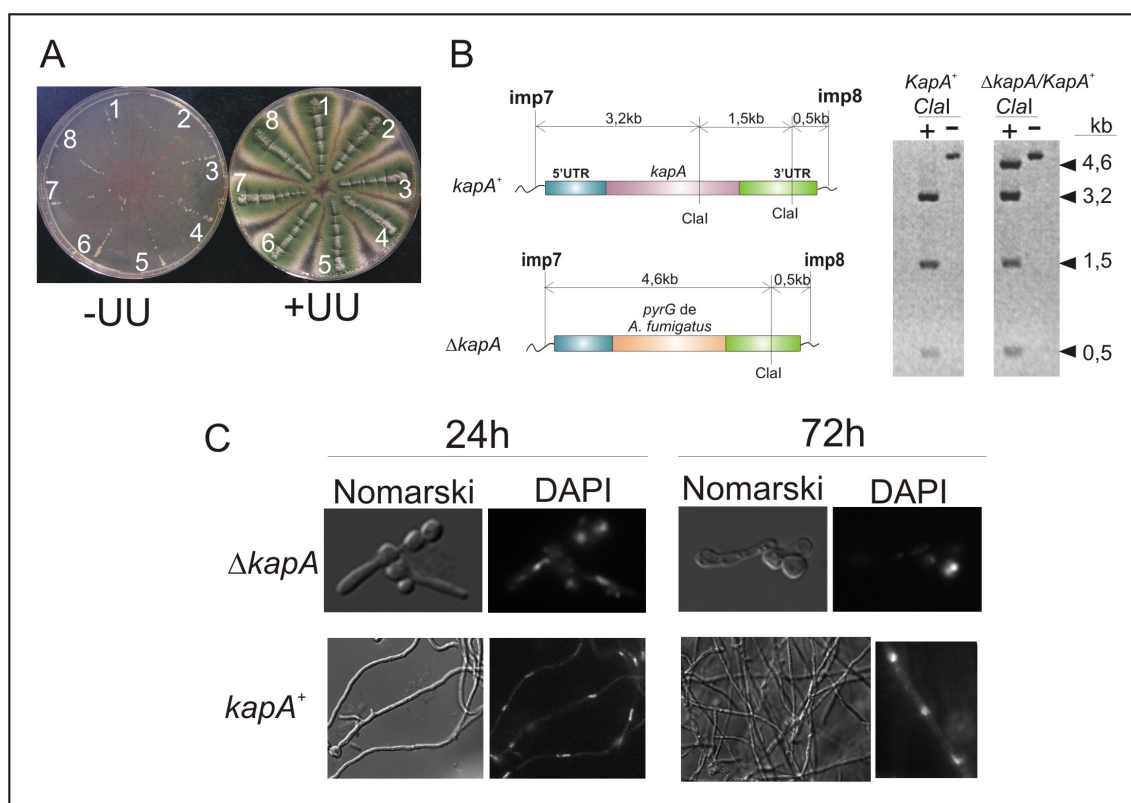


Figura II.6: Análisis del alelo nulo de *kapA*. **A)** Fenotipo en placa de los transformantes obtenidos. Conidios procedentes de estos transformantes fueron incapaces de crecer en una placa -UU (sin uracilo y uridina, a la izquierda), pero mostraron un crecimiento normal en una placa +UU (con uracilo y uridina, a la derecha). **B)** Análisis de la heterocariosis mediante PCR. En el esquema se señala la posición de la pareja de oligonucleótidos utilizada así como la posición de los sitios de corte para la enzima de restricción *ClaI* con la que fue digerido el producto de PCR. El resultado de la digestión se analizó en gel de agarosa y las bandas fueron visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio. **C)** Fenotipo terminal del alelo $\Delta kapA$. Fotografías de contraste de fase y fluorescencia (DAPI) de conidios procedentes de una cepa $\Delta kapA/kapA^+$ a las 24 y 72h de incubación en medio mínimo de *Aspergillus* sin suplementar con pirimidinas.

El análisis de la germinación de los conidios de los transformantes en medio mínimo líquido sin pirimidinas permitió caracterizar el fenotipo terminal del alelo $\Delta kapA$. Tras 24h de incubación a 25°C los conidios portadores del marcador de

selección *pyrG* de *A. fumigatus*, y por lo tanto portadores del alelo $\Delta kapA$, fueron capaces de emitir tubo germinativo si bien la longitud alcanzada por estos fue de unas pocas micras, situación notablemente diferente al crecimiento de las células observado en la cepa silvestre *pyrG* analizada como control (Fig. II.6C). A las 72h de incubación los conidios $\Delta kapA$ presentaron tubos germinativos de una longitud similar a la observada a las 24h de incubación lo que indicaba que la presencia del alelo nulo de *kapA* impedía la progresión del crecimiento. La tinción de las muestras con DAPI mostró que en todas las células observadas ($n > 20$) sólo había una acumulación de fluorescencia, lo que indicaba que la presencia del alelo $\Delta kapA$ impedía la entrada en mitosis. Teniendo en cuenta que para que se produzca crecimiento hifal es necesario que una vez duplicado el volumen de citoplasma se produzca la división de los núcleos¹⁵³, la ausencia de división nuclear observada podría explicar el hecho de que los tubos germinativos no continuaran creciendo a lo largo del tiempo (Fig. II.6C). Como control se analizó el crecimiento de conidios procedentes del heterocarionte o de una cepa $kapA^+$ en medio mínimo líquido con pirimidinas, no encontrándose diferencias entre ambos dado que en estas condiciones de cultivo podían desarrollarse los conidios $kapA^+$; *pyrG89* procedentes del heterocarionte.

2. Mutante condicional en la Importina α de *A. nidulans*.

Una de las herramientas más utilizadas en los estudios de transporte nuclear mediado por la Importina α en *S. cerevisiae* es la mutación termosensible denominada *srp1-31*⁶⁰. La mutación que porta el alelo *srp1-31* causa la sustitución del residuo serina 116 por una fenilalanina. Este residuo está conservado entre los diferentes ortólogos de la Importina α y se sitúa en la primera de las repeticiones armadillo (figura II.7A). Este cambio puntual provoca que, a la temperatura restrictiva de 37°C, Srp1-31p no sea capaz de interaccionar con las NLSs y por lo tanto las proteínas destinadas a ser transportadas por la Importina α pierdan su localización nuclear¹⁵⁴. Sin embargo, a 25°C la proteína es suficientemente funcional como para promover la localización nuclear de proteínas portadoras de NLSs clásicas.

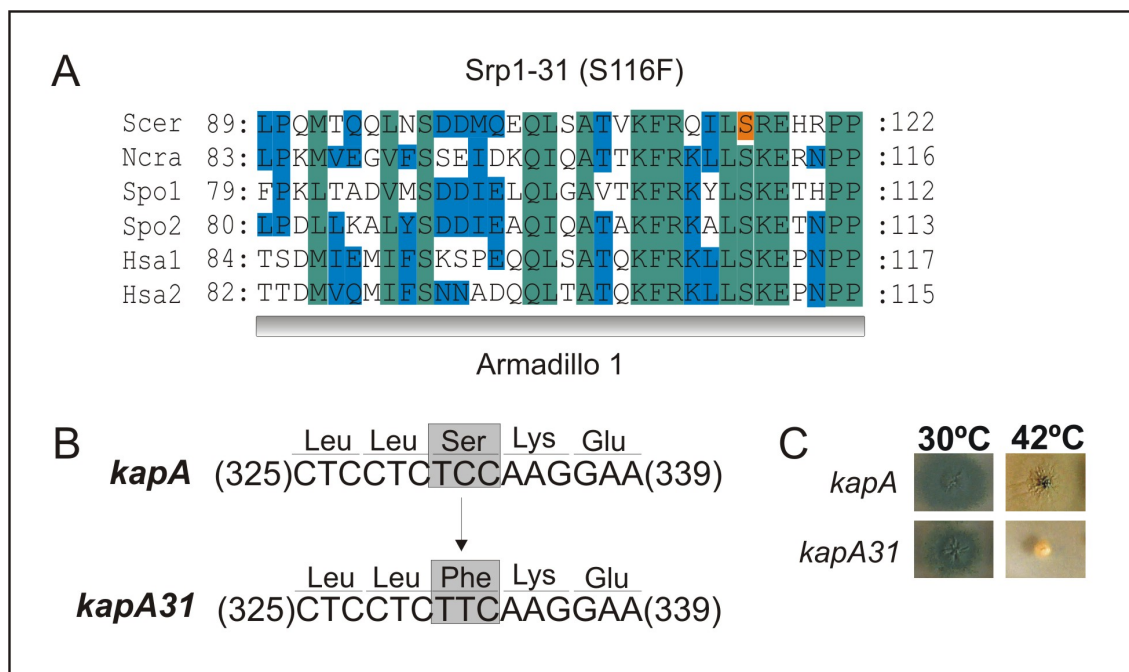


Figura II.7: Generación de un alelo mutante de la Importina α . **A)** Alineamiento mostrando la localización de la mutación *srp1-31* en la Importina α de *S. cerevisiae*. La mutación genera en la proteína Srp1p una sustitución de la serina conservada 116 por una fenilalanina, dando lugar a termosensibilidad por la pérdida de la capacidad de interaccionar con las NLSs a la temperatura restrictiva de 37°C. Scer, *Saccharomyces cerevisiae*; Ncra, *Neurospora crassa*; Spo1, Importina α 1 de *Schyzosaccharomyces pombe*; Spo2, Importina α 2 de *Schyzosaccharomyces pombe*; Hsa1, importina α 1 de *Homo sapiens*; Hsa2, importina α 2 de *Homo sapiens*. **B)** Cambio introducido en la secuencia de *kapA* de *A. nidulans* para generar en alelo mutante *kapA31*. **C)** Fenotipo de termosensibilidad producido por la presencia del alelo *kapA31*.

2.1 Generación del alelo termosensible *kapA31*.

Una vez caracterizada la región codificante de *kapA* se pudo determinar la presencia de un residuo de serina en la posición 111, que se correspondía con la serina 116 de Srp1p. Basándonos en los resultados obtenidos en *S. cerevisiae* con el mutante *srp1-31* se decidió generar un cambio Ser111-Phe en la secuencia de *kapA*. Para ello se amplificó la región codificante, usando DNA genómico, del locus *kapA* y se introdujo en un plásmido que contenía el marcador de selección *pyr-4* de *N. crassa*. Utilizando este plásmido se generó la versión mutante utilizando mutagénesis dirigida mediante PCR con oligonucleótidos específicos (oligonucleótidos α 31UP y α 31DW de la Tabla 2) que convertían el codón Ser111 (TCC) en un codón para fenilalanina (TTC) (Fig. II.7B). El plásmido se transformó en la cepa MAD1425 y se seleccionaron transformantes protótrofos para pirimidinas, los cuales fueron posteriormente analizados a 42°C para comprobar su termosensibilidad (Fig. II.7C). De aquellos que mostraban este fenotipo condicional se aisló DNA y se secuenció el locus *kapA* para comprobar la

presencia de la mutación y a continuación se verificó la correcta inserción del plásmido por Southern-blot. Este alelo mutante se designó como *kapA31*. Adicionalmente se realizó un “pop-out” para generar un reemplamiento de la secuencia original del gen *kapA* por la secuencia mutante (ver sección 5.2 de Materiales y Métodos y apartado 2 de la Parte I para más detalle) y se continuó trabajando con esta nueva cepa (MAD1545) portadora del alelo *kapA31*.

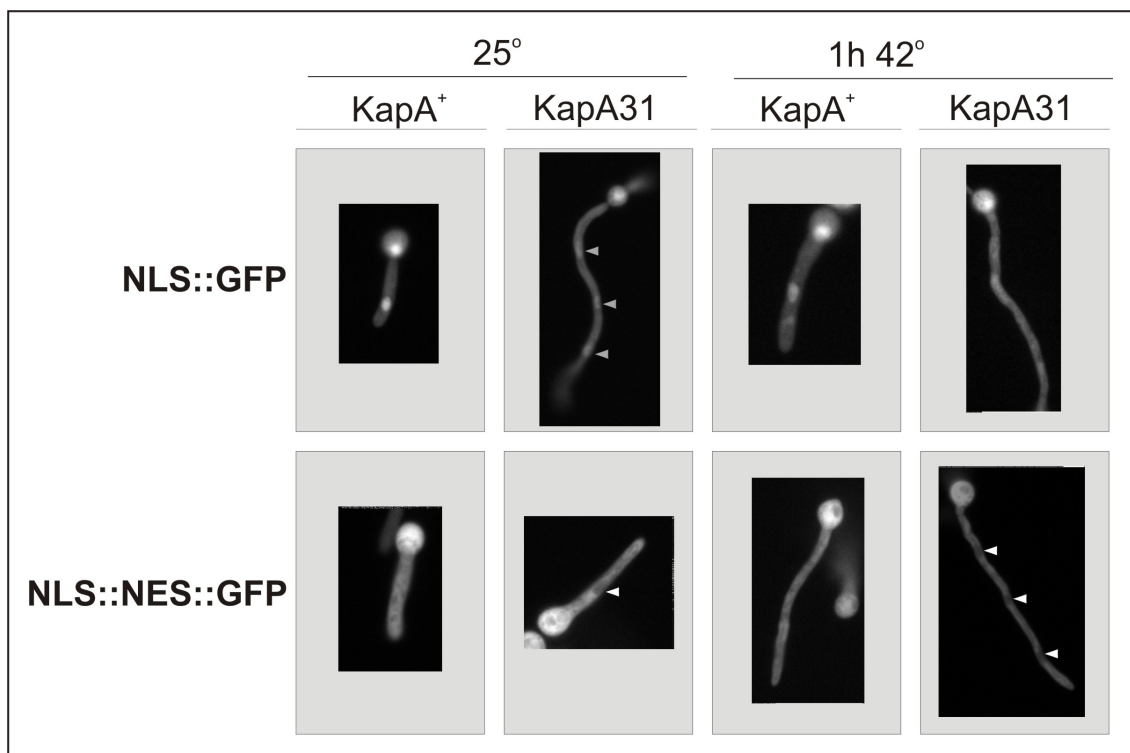


Figura II.8: Efecto del alelo termosensible *kapA31*. Análisis de la localización subcelular de las proteínas de fusión cNLS::GFP y cNLS::NES::GFP en una cepa silvestre y en una cepa *kapA31* mutante. Se muestra una germinula representativa para cada una de las condiciones ensayadas. Las puntas de flecha blancas señalan los núcleos vacíos de fluorescencia y las grises los núcleos llenos.

2.2 Efecto del alelo termosensible *kapA31* en la ruta de importación nuclear.

Para estudiar el efecto del alelo mutante *kapA31* en la ruta de importación nuclear mediada por el heterodímero Importina α/β 1, se utilizaron como herramientas las proteínas quiméricas NLS::GFP y NLS::NES::GFP, las cuáles habían servido para determinar el efecto del alelo *kapK1*, sensible a la leptomicina B, en la ruta de exportación nuclear (Fig. I.10A). A la temperatura permisiva de 25°C, la proteína quimérica NLS::GFP mostró una localización nuclear tanto en los núcleos de las células de la cepa *kapA+* como *kapA31*, aunque la intensidad de la fluorescencia era menor en la última. La incubación a 42°C durante 1h no tuvo ningún efecto en la localización de

la NLS::GFP en la cepa *kapA*⁺, sin embargo, en la cepa *kapA31* la fluorescencia pasó a distribuirse uniformemente a lo largo de toda la hifa, no pudiendo distinguirse la localización de los núcleos (Fig. II.8). Esta distribución de la fluorescencia es similar a la que presenta GFP cuando carece de una señal de importación nuclear exógena¹⁵⁵. En la cepa *kapA*⁺, la presencia de una NES en la proteína quimérica hizo que ésta se distribuyera de forma similar entre el citoplasma y el nucleoplasma a las dos temperaturas ensayadas. Sin embargo, en la cepa portadora del alelo *kapA31*, la proteína apareció excluida del núcleo, siendo esta localización más pronunciada cuando se incubó la cepa mutante a 42°C. El conjunto de estos resultados mostraban que la proteína mutante KapA31 causa un defecto en la importación nuclear de una proteína quimérica portadora de una NLS clásica. A pesar de que este defecto es más evidente a la temperatura restrictiva, no se puede descartar un efecto menor de la mutación a la temperatura permisiva, fenotipo que es previsible en fondos genéticos con mutaciones condicionales.

3. Distribución en la célula de los elementos de la ruta clásica de importación nuclear: el heterodímero Importina α /Importina β 1.

3.1 Localización subcelular de KapB.

Para estudiar la localización subcelular de KapB se generó una proteína quimérica KapB::GFP. Siguiendo el protocolo de Yang *et al.*⁶⁷ se reemplazó la región codificante del locus *kapB* por la construcción *kapB::gfp::pyrG^{A.fum}* generada mediante PCR de fusión. Los transformantes obtenidos fueron analizados por Southern-blot para verificar que se había producido un correcto reemplazamiento génico. Estos transformantes no mostraron ningún defecto de crecimiento lo que, teniendo en cuenta el fenotipo de letalidad del alelo Δ *kapB*, indicaba que la proteína quimérica generada era funcional. Al observar los transformantes con el microscopio de epifluorescencia se pudo detectar una cierta cantidad de fluorescencia dispersa por toda la hifa siendo evidente una mayor acumulación de la fluorescencia en la periferia de los núcleos (Fig. II.9A). La distribución de la fluorescencia no era homogénea por toda la periferia del núcleo, existiendo zonas con una mayor acumulación de la fluorescencia. Esta localización se asemejaba a la observada para las proteínas que componen el NPC (Fig. II.9A, imagen de Nic96::GFP), sugiriendo que KapB::GFP se acumula en la proximidad de la envoltura nuclear. Debido a la capacidad de las importinas tipo β de interaccionar

con las nucleoporinas FG es muy probable que KapB pueda estar en contacto directo con estos elementos del NPC en este hongo. En algunos casos fue posible observar un punto mucho más fluorescente (indicado en la figura por una punta de flecha blanca) que podría ser interpretado como zonas de asociación de KapB con el SPB, orgánulo organizador de microtúbulos que en *A. nidulans* está asociado a la envoltura nuclear. Adicionalmente, la observación de las muestras *in vivo* permitió detectar la presencia de acumulaciones fluorescentes móviles a lo largo de toda la hifa, siendo más prominentes en la zona apical de la célula. En esta zona fue posible observar puntos moviéndose hacia la punta de la hifa o alejándose de ella. En el panel B de la figura II.9 se muestran una serie de imágenes tomadas del vídeo 5 donde se puede observar el movimiento retrógrado de un punto fluorescente (indicado por una punta de flecha negra).

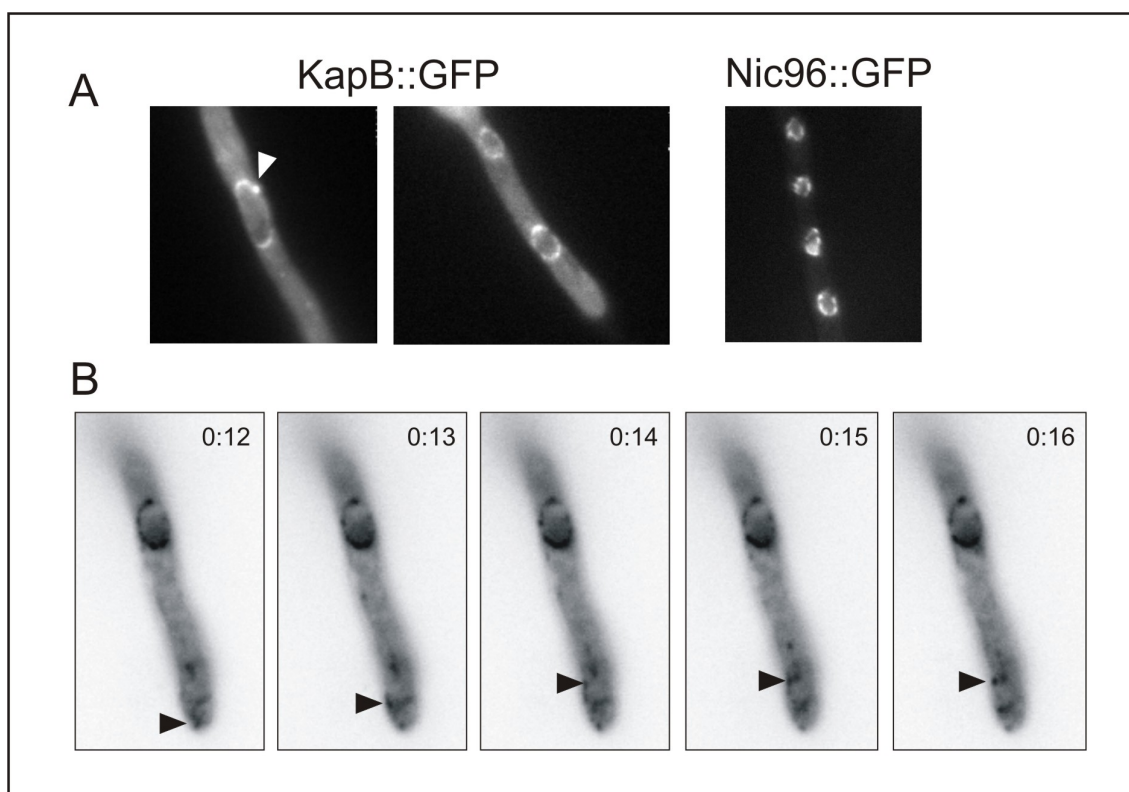


Figura II.9: Localización subcelular de KapB::GFP. **A)** Fotografías obtenidas con el microscopio de epifluorescencia al analizar una cepa que expresa la proteína KapB::GFP. La fluorescencia se localiza en la periferia de los núcleos. Se muestra también una fotografía de la nucleoporina Nic96 cuya localización subcelular recuerda a la de KapB. La punta de flecha blanca indica la posición de un punto más fluorescente que podría interpretarse como zonas de asociación de KapB con el SPB. **B)** Serie de imágenes tomadas del vídeo 5 donde se pueden observar puntos fluorescentes que se desplazan por el citoplasma (indicado con una punta de flecha).

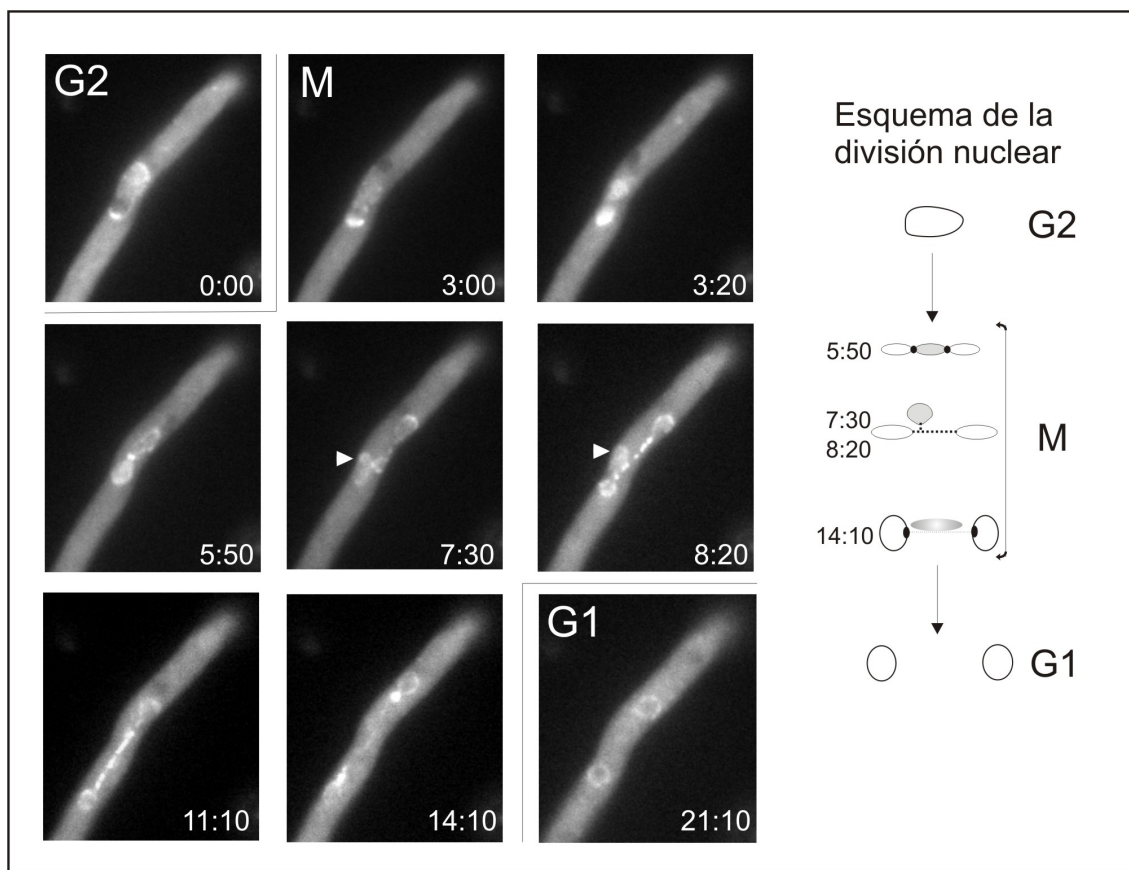


Figura II.10: Localización subcelular de KapB durante la mitosis. Serie de fotogramas mostrando la localización de KapB::GFP durante el proceso de mitosis. Las puntas de flecha señalan el nucleolo y los números indican el tiempo (en minutos y segundos) transcurrido entre cada fotografía. A la derecha se muestra un esquema de la morfología de los núcleos a lo largo del proceso de mitosis, en gris se indica la posición del nucleolo durante el proceso.

De forma similar al estudio de la Exportina-1 KapK, el análisis de la localización subcelular de KapB durante la mitosis fue de especial interés para este trabajo, para determinar si existen cambios en su disposición debidos a la pérdida del transporte activo ocasionado por el desensamblaje parcial del NPC durante la mitosis de tipo cerrado y por la localización perinuclear que exhibe KapB. Como se puede observar en la Fig. II.10 y en el vídeo 6 asociado, KapB::GFP continuó mostrando localización perinuclear durante el proceso de mitosis, hecho que permitió seguir en detalle la evolución del núcleo mitótico durante todo el proceso. En el momento de inicio de la mitosis (ver Fig. II.10, indicado con “M”) se produjo un ligero cambio en la localización de KapB. Transcurridos aproximadamente tres minutos ($t=5:50$) desde el comienzo de la mitosis se pudo observar la zona de constricción por donde iba a producirse la división del núcleo. Una vez producido este estrangulamiento, los dos núcleos hijos generados quedaron unidos por un resto de envoltura nuclear. Las últimas imágenes muestran la ruptura de este “puente de unión” para dar lugar a los núcleos

hijos independientes; proceso en el que, muy probablemente, participó en gran medida la tracción mecánica que se debía estar ejerciendo desde los polos opuestos a través de los microtúbulos astrales generados por los SPBs de cada núcleo hijo ¹⁵⁶. Durante el proceso de mitosis también fue posible observar la división del nucleolo (indicado con una punta de flecha blanca en las imágenes correspondientes a los tiempos 7:30 y 8:20). Este orgánulo quedó rodeado por restos de la envoltura nuclear tras el estrangulamiento inicial (t=7:30) y no se dividió hasta la anafase tardía/telofase. Para una mejor comprensión del proceso se representa en la figura II.10 un esquema de la evolución de la morfología nuclear durante la mitosis. Debido a la posición del nucleolo al inicio del proceso, en las imágenes no fue posible observar la doble constricción inicial que deja al nucleolo separado de los dos núcleos hijos. La visualización del comportamiento de la envoltura nuclear utilizando KapB como marcador, concuerda con las observaciones del grupo del Prof. S. Osmani sobre la localización de las nucleoporinas estructurales del poro nuclear, que permanecen en la membrana nuclear durante la mitosis, y con el proceso de división del nucleolo (¹⁰⁰ y resultados sin publicar).

3.2 Localización subcelular de KapA.

Para determinar la localización subcelular de KapA se siguió el mismo protocolo utilizado para generar las versiones etiquetadas de KapK y KapB, si bien en este caso se empleó la proteína fluorescente mRFP, para posteriormente poder observar simultáneamente el comportamiento de la Importina α y su transportador KapB. Así, se reemplazó la región codificante del locus *kapA* por la construcción *kapA::mrfp::pyrG^{A.fum}* generada mediante PCR de fusión. Los transformantes obtenidos fueron analizados por el método de Southern-blot para verificar que se había producido un correcto reemplazamiento génico. La quimera debe ser considerada funcional dado que los transformantes no exhiben el fenotipo de letalidad de la cepa portadora del alelo $\Delta kapA$.

La proteína KapA::mRFP se localizaba principalmente en los núcleos, quedando excluida en cada uno de ellos del nucleolo. También se observó una cierta cantidad de fluorescencia citoplásmica (Fig. II.11A). El análisis de las muestras *in vivo* permitió distinguir la presencia de acumulaciones fluorescentes móviles en el citoplasma, similares a las observadas con el etiquetado de KapB. Estas acumulaciones se desplazan a lo largo de la célula en ambos sentidos respecto al ápice de la hifa, movimientos anterógrados y retrógrados (Fig. II.11B y vídeos 7).

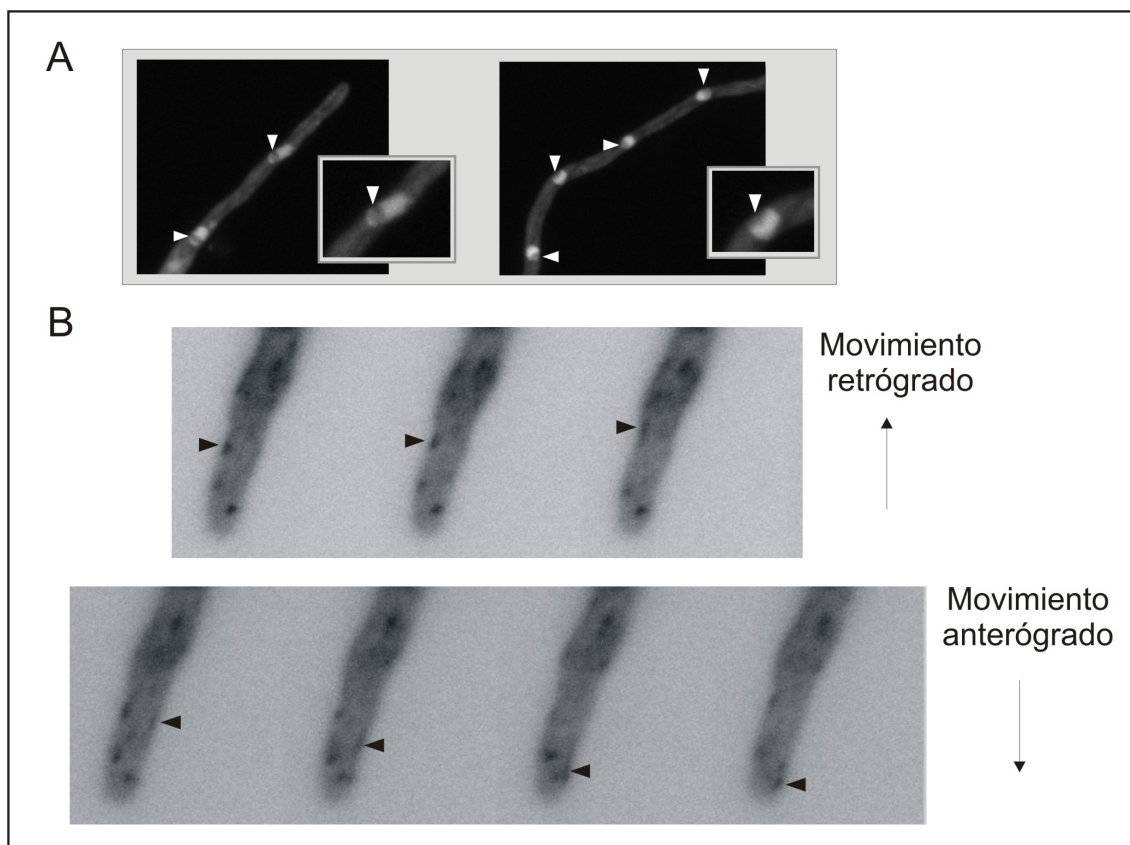


Figura II.11: Localización subcelular de KapA::mRFP. **A)** Imágenes obtenidas con el microscopio de epifluorescencia donde se observa la localización subcelular de KapA::mRFP. Las puntas de flecha blancas señalan los nucleolos **B)** Series de instantáneas donde se observan puntos fluorescentes desplazándose por el citoplasma tanto alejándose de la punta de la hifa (movimiento retrógrado, vídeo 7) como acercándose a ella (movimiento anterógrado, vídeo 7).

La observación de las muestras durante periodos mas prolongados permitió determinar la localización de KapA::mRFP durante la mitosis. Al comienzo de la división nuclear se produjo una disminución en la intensidad de la fluorescencia nuclear, lo que indicaba que la Importina α estaba saliendo del núcleo hacia el citoplasma. Sin embargo, la cantidad de fluorescencia remanente en los núcleos mitóticos no se igualó con la visualizada en el citoplasma, lo que sugiere que una cierta cantidad de la proteína KapA permanece retenida en el interior del núcleo durante todo el proceso. Por lo tanto el comportamiento de este transportador se asemeja al observado para la Exportina-1, KapK (ver Parte I, apartado 5). Así mismo, también fue posible observar, como con la Importina β 1, el proceso de división del nucleolo durante la mitosis. En este caso gracias a que el nucleoplasma aparece iluminado con la fluorescencia de KapA::mRFP (Fig. II. 12 y vídeo 8).

Con el fin de analizar la colocación del heterodímero KapA/KapB se procedió a obtener una cepa que expresara conjuntamente KapA::mRFP y KapB::GFP.

Mediante cruces se intentó conseguir la cepa doblemente etiquetada, sin embargo, no fue posible identificar entre la progenie esta clase de recombinantes, por lo que se concluyó que la combinación de ambas proteínas etiquetadas daba lugar a un heterodímero afuncional y, por lo tanto, de acuerdo con los alelos nulos simples, a un fenotipo de letalidad. Consecuentemente se continuó la caracterización y observación de cada proteína por separado.

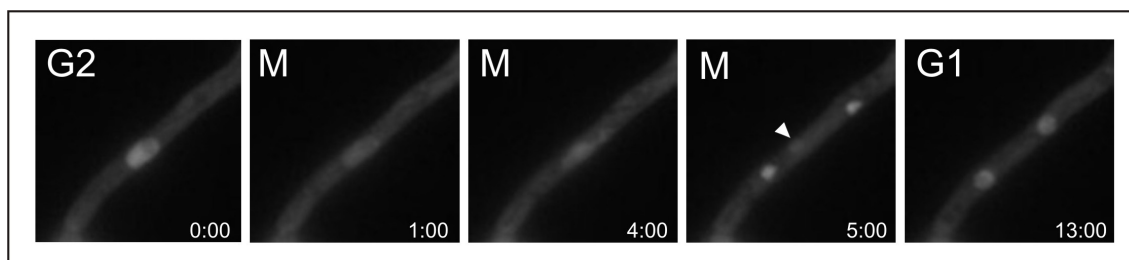


Figura II.12: Localización subcelular de KapA durante el proceso de mitosis. Serie de imágenes obtenidas a lo largo del tiempo en las que se observa el cambio de localización que se produce en KapA durante el proceso de mitosis. La punta de flecha señala el nucleolo. El tiempo transcurrido, en minutos, se indica en cada fotografía. Ver vídeo 8.

La observación *in vivo* de las formas etiquetadas de las Importinas α y $\beta 1$ ha permitido obtener uno de los resultados más interesantes de esta tesis: la observación de puntos fluorescentes móviles en el citoplasma, mostrando que tanto la Importina α como la Importina $\beta 1$ se desplazan por el citoplasma, al menos, hasta el ápice de la hifa. En el caso de la Importina α existen varios trabajos en los que se ha demostrado su asociación con elementos de los dos tipos de citoesqueleto¹⁵⁷⁻¹⁵⁹, por ello, se decidió utilizar las herramientas genéticas y moleculares disponibles en el laboratorio para determinar si la movilidad de los ambos transportadores por el citoplasma era dependiente del citoesqueleto de microtúbulos y/o del de microfilamentos de actina.

3.3 Papel del citoesqueleto en la localización subcelular de la Importina α y la Importina β .

La capacidad de interaccionar con los citoesqueletos de actina y tubulina es una característica de determinadas proteínas con dominios armadillo, como spKAP115, APC, Pfl6 y smgGDS, que interaccionan con los microtúbulos, o Vac8p que interacciona con los microfilamentos de actina (ver citaciones en referencia¹⁵⁹).

Para determinar si KapA utiliza el citoesqueleto de tubulina para desplazarse por el citoplasma se trataron las células de *Aspergillus* con un compuesto desestabilizador

de microtúbulos, el benomilo. Se incubaron conidios de la cepa que expresaba la proteína KapA::mRFP en un medio con benomilo durante 15-20min, tras los cuales se procedió a la observación de las muestras al microscopio. Como se muestra en el panel A de la figura II.13 la presencia de benomilo en el medio causó la aparición de puntos inmóviles en el citoplasma, lo que parecía indicar que la Importina α no se estaba desplazando a lo largo de la hifa.

Los microtúbulos que llegan al ápice de la hifa se concentran en un punto muy próximo al Spitzenkörper^{160,161}. Llegados a este punto las moléculas o vesículas que están siendo transportadas en el extremo (+) de los microtúbulos son transferidas a los cables de actina que emergen desde el Spitzenkörper para, a través de ellos, llegar al ápice de la hifa¹⁶². Para determinar si la Importina α podría estar utilizando este mecanismo para aproximarse a la punta de la hifa, se procedió a estudiar el posible papel del citoesqueleto de actina en la localización de KapA. Para ello se utilizó latrunculina B (LatB), un compuesto que produce la despolimerización de los filamentos de actina. La incubación de la cepa que expresaba KapA::mRFP en un medio de cultivo que contenía 100 μ M de LatB provocó la aparición de dos puntos muy fluorescentes en la punta de la hifa tras los cuales aparecía una zona sin fluorescencia y una fuerte acumulación tras ella en la que no se detectó movimiento de una forma muy evidente (Fig. II.13B). Los puntos fluorescentes observados en el ápice de la hifa podrían corresponder a proteína que ha quedado retenida en esa zona tras la despolimerización de los cables de actina. Estos resultados parecían indicar que la hipótesis anterior era cierta y que la F-actina también juega un papel importante en la distribución dinámica de KapA en la célula.

Dada la similitud entre los “cometas” de KapA y KapB también se analizó el efecto del tratamiento con benomilo y latrunculina B sobre la distribución de la Importina β en la célula. El tratamiento con benomilo tuvo un efecto similar al observado en la cepa que expresaba la proteína quimérica KapA::mRFP, observándose puntos fluorescentes inmóviles tras la adición al medio de 3 μ g/mL de benomilo (Fig. II.13D). Sin embargo, no se observó ningún efecto en la localización subcelular de KapB::GFP cuando se añadió al medio LatB, siendo aún evidente la presencia de puntos fluorescentes móviles (Fig. II.13E). Estos resultados volvían a poner de manifiesto el importante papel que desempeñan los microtúbulos en el desplazamiento de los transportadores. Además, los diferentes resultados obtenidos en el tratamiento con LatB

indicaban que aunque KapA y KapB formen parte de un mismo complejo su movimiento por el citoplasma debe ser, al menos en parte, independiente.

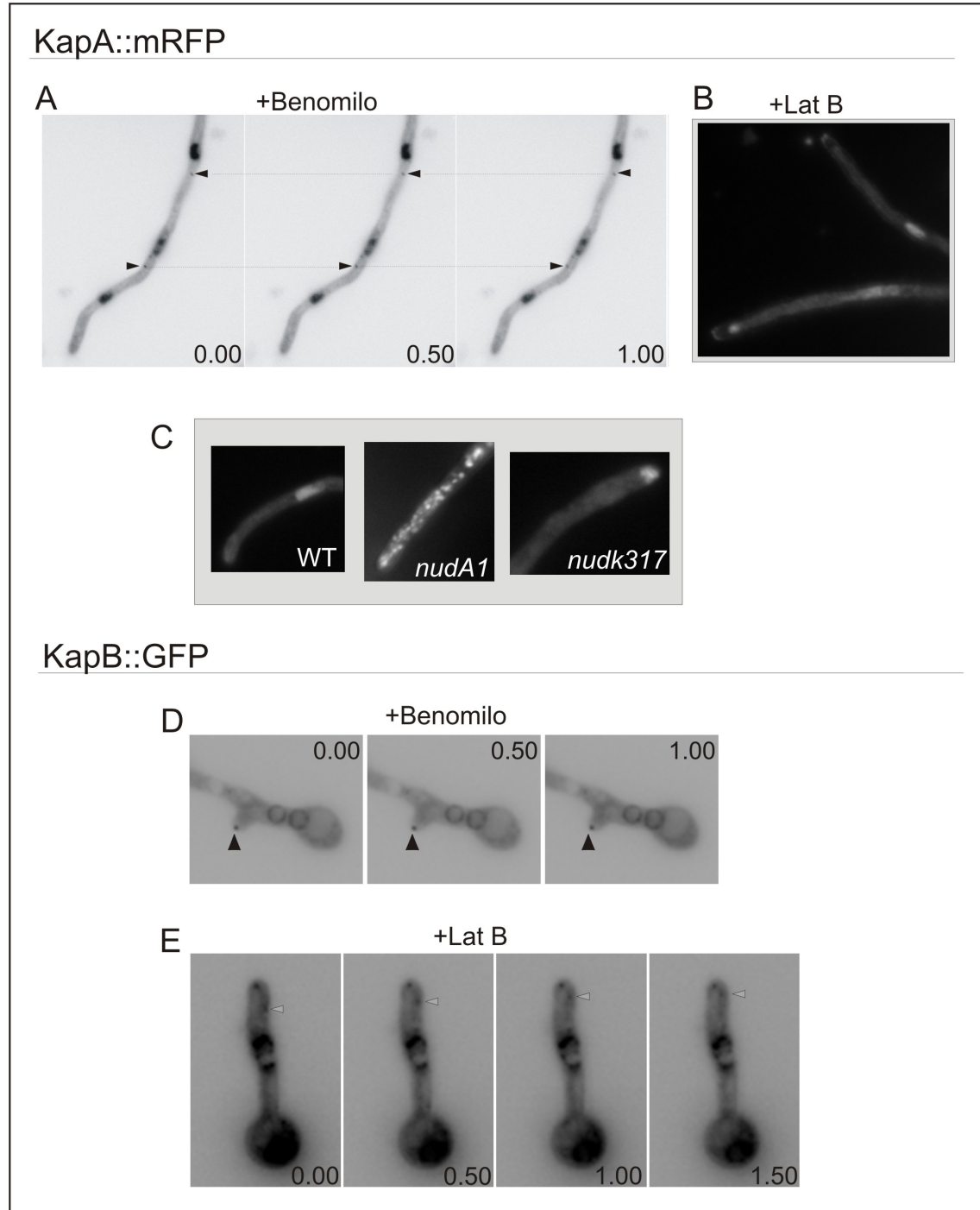


Figura II.13: Papel del citoesqueleto en la localización subcelular de KapA y KapB. A y B) Efecto del benomilo (A) y la latrunculina B (B) en la localización subcelular de KapA::mRFP. En A se muestra una serie de imágenes tomadas a lo largo del tiempo de incubación con la droga. **C)** Efecto de la mutación *nudA1* y la mutación *nudK317* en la localización subcelular de KapA::mRFP comparado con una cepa silvestre (WT). **D y E)** Efecto del benomilo (D) y la latrunculina B (E) en la localización subcelular de KapB::GFP. Series de imágenes tomadas a lo largo del tiempo tras las respectivas adiciones de las drogas. En todos los casos, las puntas de flecha negras señalan puntos que permanecen inmóviles como consecuencia del tratamiento con benomilo. Las puntas de flecha grises en D señalan un punto que se desplaza por el citoplasma. En cada fotografía se indica el tiempo transcurrido en segundos.

3.4 El motor dineína/dinactina está implicado en el transporte de la Importina α .

En *A. nidulans* el etiquetado con proteínas fluorescentes ha permitido la descripción del movimiento de diferentes subunidades tanto de la dineína, por ejemplo la subunidad grande NudA, como de la dinactina a lo largo de la célula, observándose “cometas”, o acumulaciones fluorescentes moviéndose a gran velocidad en el citoplasma ¹⁶³. El hecho de que la Importina α muestre una localización similar en la célula sugiere que podría estar asociada al motor dineína o dineína/dinactina. Para verificar esta hipótesis se utilizaron dos mutantes termosensibles alterados en diferentes subunidades del complejo dineína/dinactina: un mutante en la subunidad pesada de la dineína (*nudA1*) y un mutante en la subunidad Arp1 de la dinactina (*nudK317*). Para ello se cruzó la cepa portadora de la versión etiquetada de KapA (KapA::mRFP) con cada una de las cepas portadoras de los alelos mutantes. Los descendientes del cruce fueron analizados a 42°C para comprobar su termosensibilidad y con el microscopio de fluorescencia para comprobar la presencia del alelo que expresa KapA::mRFP. Las nuevas cepas generadas se analizaron con un microscopio invertido que permitió observar las muestras *in vivo* y realizar cambios de temperatura para observar el efecto de las mutaciones. Como se observa en la figura II.13C la presencia del alelo mutante *nudA1* provocó la aparición de acumulaciones de fluorescencia por todo el citoplasma cuando las muestras fueron incubadas a 42°C, fenotipo completamente diferente al observado en la cepa *nudA⁺, kapA::mrfp*. En el caso de la cepa *nudK317, kapA::mrfp* el fenotipo observado a 42°C consistió en una acumulación de la fluorescencia en la punta de la hifa, no siendo evidente la presencia de puntos fluorescentes que se desplazaran por el citoplasma (Fig. II.13C). Estos resultados sugerían que la Importina α estaba siendo transportada por el complejo dineína/dinactina. Este complejo se desplaza hacia la punta de la hifa de forma pasiva, unido al extremo (+) de los microtúbulos,

aprovechando el crecimiento de los mismos ¹⁶⁴. El movimiento hacia el extremo (-) de los microtúbulos requiere la hidrólisis de ATP por parte de la dinactina. En el mutante *nudk317* KapA podría ser transportada hasta el ápice de la hifa pero la mutación en la subunidad Arp1 de la dinactina impediría el movimiento retrógrado, quedando la Importina α acumulada en la punta de la hifa.

Según los resultados de la sección anterior, los microtúbulos desempeñarían un papel esencial en el movimiento de KapA, siendo las “carreteras” por donde se desplazaría el complejo dineína/dinactina en asociación con KapA. El hecho de que los microtúbulos no puedan interaccionar con proteínas apicales podría impedir también la activación de la dinactina (subunidad motora del complejo dineína/dinactina) y, por tanto, el movimiento retrógrado de KapA. Además, hay que recordar que NudK es una “actin related protein” que se dispone formando filamentos por lo que el tratamiento con LatB también podría afectar a la integridad de esta subunidad de la dinactina. Recogiendo la anterior información es posible establecer un modelo donde la Importina α llegaría hasta la zona subapical transportada por la dineína y/o dineína/dinactina sobre los microtúbulos y una vez allí la F-actina, tanto por los cables de actina como las formas polimerizadas de las *Actin related proteins* sería necesaria para, quizás, la captura de la carga en la zona de la punta de la hifa y el movimiento retrógrado de la importina hacia el interior celular.

4. Caracterización de cargas de la ruta de importación nuclear mediada por la Importina α .

Para comprender los mecanismos moleculares que median la función de la Importina α se realizó una búsqueda de proteínas capaces de interaccionar con KapA. Este trabajo se abordó por dos vías diferentes: se realizó un análisis proteómico de proteínas que fueron capaces de ser retenidas en una matriz cargada con KapA y en segundo lugar, la colaboración con otro grupo llevó a la identificación del regulador de la conidiación en dependencia de luz, la proteína VeA, como una carga de este importador nuclear.

4.1 Identificación de proteínas capaces de interaccionar con la Importina α .

Para identificar posibles cargas de la importina se realizó un experimento de afinidad que ya había sido utilizado previamente por otros grupos para descubrir

interacciones entre proteínas pertenecientes a la maquinaria de importación y exportación nuclear³³. Para llevar a cabo el experimento se expresó en *E. coli* una versión mutante de la Importina α , KapA⁵⁰, que llevaba unido a su extremo N-terminal dos dominios Z de la proteína A de *Staphylococcus aureus* capaces de interactuar con la IgG. KapA⁵⁰ es una versión trunca de 50kDa de KapA que carece del dominio auto-inhibitorio (IBB). La delección de este dominio aumenta los niveles de expresión de la proteína de fusión (ZZ::KapA⁵⁰) a la vez que deja libre potenciales sitios de unión para proteínas que interaccionen con la Importina α .

A través de una columna de afinidad de IgG-sefarosa precargadas con ZZ::KapA⁵⁰ se hizo pasar un extracto de *A. nidulans* que había sido previamente tratado con IgG-sefarosa para disminuir el número de interacciones inespecíficas (sección 7.4 de Materiales y Métodos). Como control del experimento este extracto se incubó también con una columna de IgG-sefarosa cargada con ZZ (Fig. II.14A). Las proteínas retenidas se visualizaron mediante tinción con plata en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (Fig. II.14B). La comparación de los patrones de bandas obtenidos a partir de los eluidos de las dos columnas, IgG::ZZ::KapA⁵⁰ e IgG::ZZ, permitió identificar un conjunto de bandas que aparecían específicamente en el eluido de la columna de afinidad con ZZ::KapA⁵⁰. Para conocer de qué proteínas se trataban, estas bandas fueron escindidas del gel, digeridas con tripsina y los péptidos obtenidos fueron analizados mediante espectrometría de masas (sección 7.5 de Materiales y Métodos). La comparación de los resultados de espectrometría de masas con las digestiones de tripsina teóricas para el proteoma de *A. nidulans* permitió identificar 12 de las 16 bandas que fueron analizadas. De estas 12 proteínas tan sólo 6 de ellas parecían interactores genuinos de la Importina α (Fig. II.14C y tabla 3). La banda A es el producto del *locus* ANI413.3 y corresponde a una proteína que lleva a cabo la poliadenilación de los mRNAs. Las bandas B y C corresponden a los ortólogos de Hsp90 y Hsp70 de *A. nidulans*. Estas dos chaperonas aparecen con bastante frecuencia en ensayos de afinidad, sin embargo, en este caso no parece tratarse de una unión inespecífica dado el importante papel que desempeñan estas chaperonas en la importación y en el transporte citoplásmico de proteínas¹⁶⁵. La banda D es NudK, el ortólogo de Arp1p en *A. nidulans*, cuyo alelo mutante *nudK317* causa una alteración en la localización subcelular de KapA (ver apartado 3.2.1 de la Parte II). Las otras dos bandas, E y F, corresponden a proteínas que probablemente interaccionan con el DNA. La banda E es el producto del

gen *AN7753.3* y ha sido identificado como la subunidad de 70kDa de la helicasa Ku70/Ku80 denominada nKuA en *A. nidulans*. La banda F corresponde al producto del gen *AN8170.3* y no ha sido investigada anteriormente. Esta proteína es muy similar a Vps75p, una proteína nuclear ¹⁰² requerida para la correcta distribución de la carboxipeptidasa Y hacia la vacuola ¹⁶⁶ y con capacidad para ensamblar nucleosomas ¹⁶⁷.

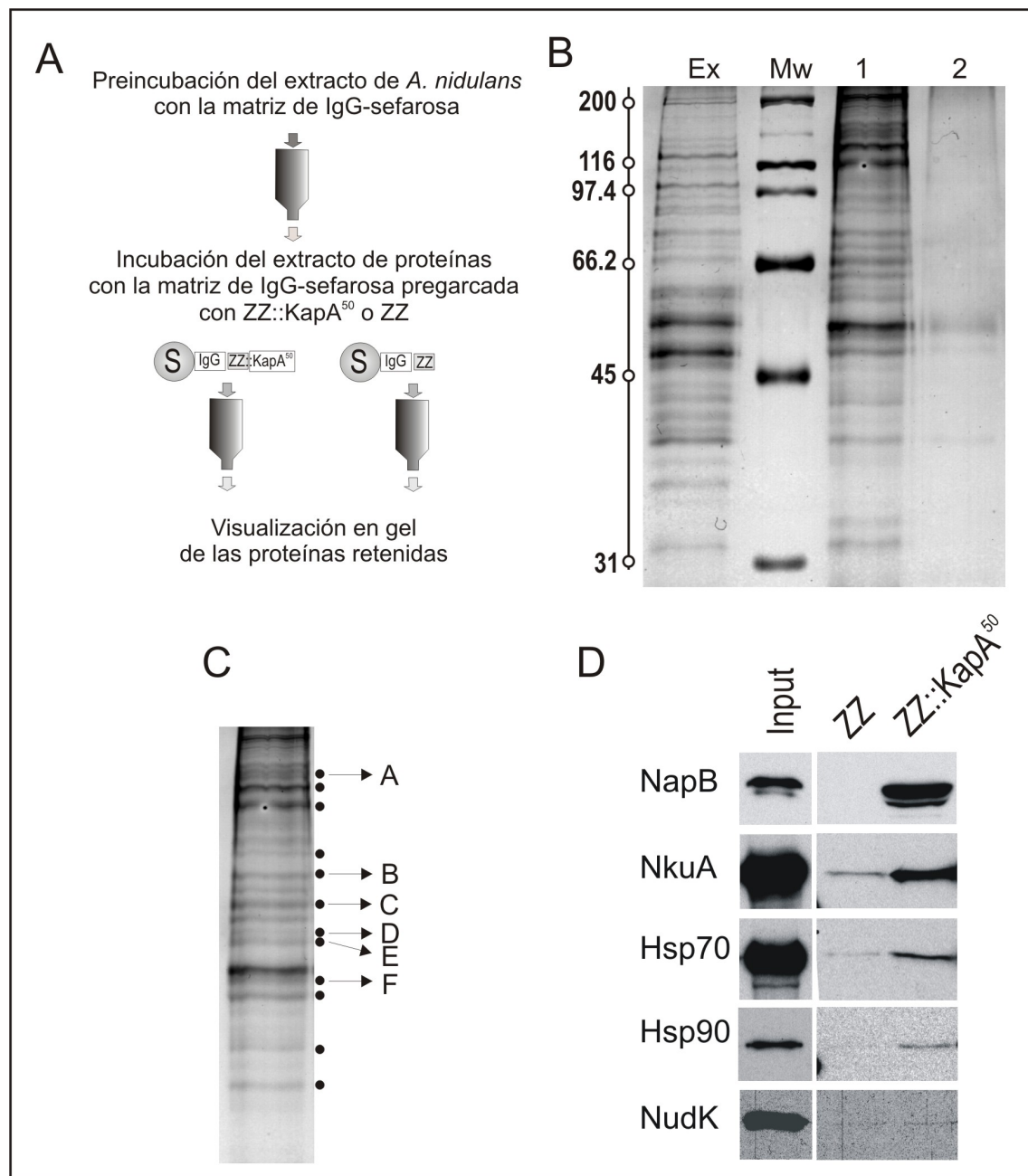


Figura II.14: Identificación de proteínas que interaccionan con KapA. **A)** Representación esquemática del protocolo utilizado. **B)** Gel de poliacrilamida en el que se observan las proteínas retenidas por las columnas de afinidad cargadas con KapA⁵⁰ (1) o con el polipéptido ZZ (2). Ex representa 25µg del extracto total de proteínas de *A. nidulans*. A la izquierda se indican los pesos moleculares, en kDa, del marcador utilizado. **C)** Línea 1 del gel mostrado en B donde se indican las bandas que fueron identificadas por espectrometría de masas (ver tabla 3). **D)** Experimento de interacción *in vitro* entre ZZ o ZZ::KapA⁵⁰ y las diferentes proteínas identificadas expresadas *in vitro* mediante el sistema de TNT. Los “input” corresponden a: 1/5 de la cantidad total utilizada de NapB, NkuA y Hsp70, 1/2 de la cantidad total utilizada de Hsp90 y NudK marcadas radiactivamente.

Tabla 3. Proteínas identificadas por espectrometría de masas.

Banda	Locus	Peso molecular (Da)	Posible función	Péptidos ⁽²⁾
A	AN1413.3	147.851	Proteína implicada en poliadenilación de mRNAs	10 (9)
B	AN8269.3	79.818	Heat shock protein 90	13 (20)
C	AN5129.3	70.045	Heat shock protein 70	12 (23)
D	AN1953.3	43.198 ⁽¹⁾	Actin related protein 1, Nudk	5 (17)
E	AN7753.3	71.298 ⁽¹⁾	Subunidad de 70kDa de la helicasa Ku70/Ku80	5 (11)
F	AN8170.3	40.849 ⁽¹⁾	Proteína de la familia Nap/SET	5 (16)

⁽¹⁾ Proteínas con una movilidad electroforética anormal comparada con su hipotético peso molecular.

⁽²⁾ Los números entre paréntesis indican el porcentaje de la proteína cubierto mediante los péptidos identificados

Para confirmar la interacción entre KapA y las proteínas identificadas por espectrometría de masas se realizó un ensayo de doble híbrido. Para ello se amplificaron los DNAs codificantes de cada una de las proteínas candidatas (bandas B, C, D, E y F) y se introdujeron en el plásmido de doble híbrido pGBKT7 para ser expresadas como fusiones al dominio de unión a DNA de Gal4p. El cDNA de KapA⁵⁰ se introdujo en el plásmido pGADT7 portador del dominio de activación de Gal4p. La combinación del plásmido que expresaba KapA⁵⁰ con cada uno de los posibles interactores se cotransformó en las cepas de *S. cerevisiae* Y187, portadora del marcador de ensayo de doble híbrido LacZ, y en la cepa AH109, con los genes reporteros Ade2 y His3. Se analizaron varios transformantes de cada combinación y en ninguno de los casos se pudo detectar actividad β-galactosidasa o crecimiento en placas sin histidina o adenina. La ausencia de detección de las interacciones en el sistema del doble híbrido podría deberse a que las proteínas analizadas no adquieran la conformación adecuada en la levadura o a que la presencia del dominio de unión a DNA de Gal4p impida la interacción con KapA.

A la vista de estos resultados se decidió realizar un ensayo de interacción proteína-proteína *in vitro*. Para ello las cinco proteínas candidatas se expresaron *in vitro* mediante el sistema de TNT a partir de los plásmidos recombinantes pGBKT7 donde habían sido introducidos los respectivos cDNAs. Como cebo en el experimento de interacción se utilizó ZZ::KapA⁵⁰, cargando con esta proteína la resina de IgG-sefarosa antes del experimento. Como control se utilizó resina precargada únicamente con el epítipo ZZ. Como se muestra en la figura II.14D, en este ensayo *in vitro* se pudo detectar interacción entre KapA y las proteínas ensayadas excepto en el caso de NudK. El resultado negativo obtenido con NudK podría deberse a que la interacción observada no sea directa sino que requiera la presencia de otra u otras proteínas.

Como se ha mencionado anteriormente, el producto del gen *AN8170.3* es muy similar a Vps75p de *S. cerevisiae*, una proteína que pertenece a la familia de proteínas tipo Nap (“nucleosome assembly protein”)/SET. Este tipo de proteínas son capaces de interaccionar con las ciclinas tipo B¹⁶⁸. Además, en *S. cerevisiae* se ha demostrado que existe interacción genética entre *SRP1*, el homólogo de la Importina α , y *CDC28*, gen que codifica para la subunidad catalítica de la principal ciclina dependiente de quinasa¹⁵⁴. Debido a esto se decidió realizar una mayor caracterización del gen *AN8170.3*.

4.2 La proteína NapB y su interacción con la Importina α .

4.2.1. Las proteínas con dominios “Nucleosome assembly proteins” en *A. nidulans*, NapA y NapB.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el *locus* *AN8170.3* reveló la existencia de un dominio *nucleosome assembly protein* “Nap” (PF00956) característico de la familia de proteínas tipo Nap/SET¹⁶⁹. La búsqueda en la base de datos de *A. nidulans* de proteínas portadoras de este tipo de dominio, llevó a la identificación de otra proteína que contenía en su secuencia un dominio Nap, el producto del gen *AN8863.3*. La comparación de su secuencia con las bases de datos de otros organismos mediante búsquedas tipo Blastp reveló que *AN8863.3* es el ortólogo de Nap1p de *S. cerevisiae*. Por lo tanto, se decidió denominar al *locus* *AN8863.3* como *napA* y al *locus* *AN8170.3* como *napB*. Nap1p, una chaperona de histonas implicada en la remodelación de la cromatina, es uno de los miembros mejor caracterizados de esta familia de proteínas y participa en el transporte de histonas del citoplasma al núcleo

^{170,171}.

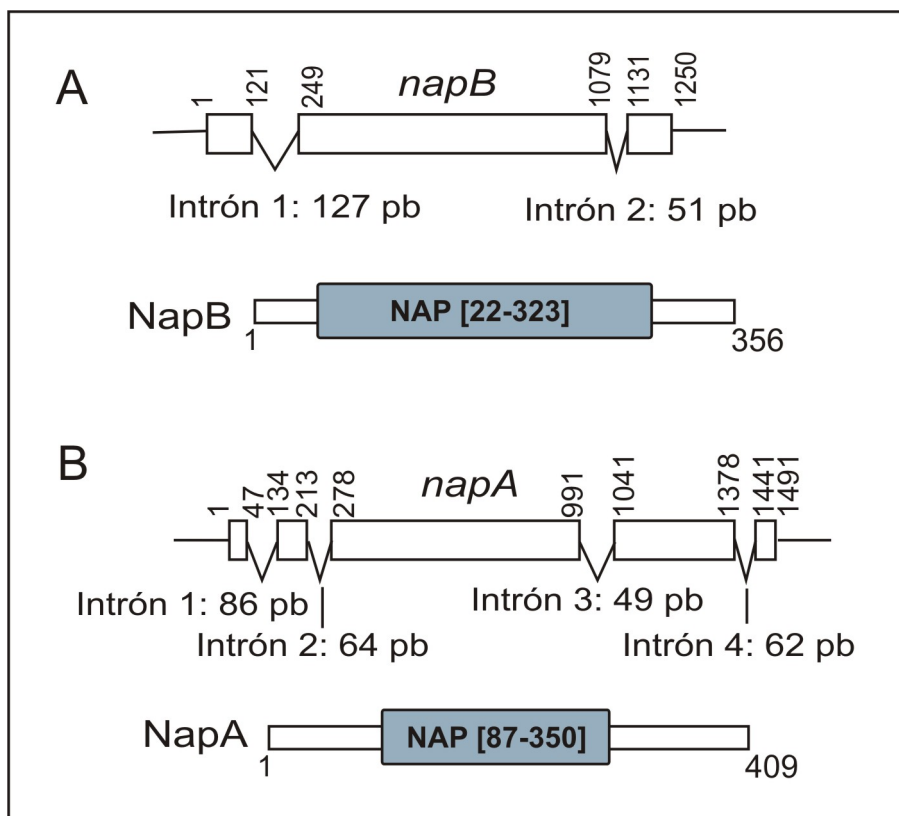


Figura II.15: Miembros de la familia Nap/SET identificados en *A. nidulans*. **A)** Estructura del gen *napB* (parte superior) en la que se indican las coordenadas de las exones y la longitud de los intrones así como la posición del dominio NAP (PFAM PF00956) en NapB (abajo). **B)** Estructura del gen *napA* (parte superior) en la que se indican las coordenadas de los exones y la longitud de los intrones y esquema de NapA en el que se indica la posición del dominio NAP.

La caracterización de las versiones genómica y cDNA de *napA* y *napB* confirmó la organización en intrones y exones predicha por la base de datos de *A. nidulans* con la única excepción del intrón 3 de *napA*. El dominio Nap de NapB se localiza entre los residuos 22 y 323 lo que supone casi un 85% de la proteína; en el caso de NapA este dominio, localizado entre los aminoácidos 87 y 350, supone un 64% de la proteína (Fig. II.15 A y B). NapA posee un 58% de similitud con Nap1p y en ella se pueden distinguir los dominios estructurales y regiones funcionales definidas en Nap1p (Fig. II.16), incluyendo la señal de localización nuclear (NLS) y la señal de exportación nuclear (NES). El grado de similitud entre NapB y otras proteínas de la familia Nap/SET es menor; sin embargo, es más parecida en su secuencia de aminoácidos a las proteínas SET humanas (26% de similitud) que a las proteínas Nap1p humanas o fúngicas (23% y 21% de similitud, respectivamente).

Nap1p se localiza en el núcleo y en el citoplasma gracias a la presencia de las anteriormente mencionadas NLS y NES. La NLS es reconocida por la importina Kap114p¹⁷² que lleva a cabo la importación de Nap1p al núcleo. Las proteínas SET,

NapB y Vps75p carecen de estos elementos de transporte característicos de Nap1p y sus ortólogos en metazoos^{167,169} lo que sugiere que NapB y Vps75p son los ortólogos fúngicos de las proteínas eucariotas tipo SET. La ausencia de una NLS como la de Nap1p sugiere además que NapB y Vps75p usarían una ruta de importación nuclear independiente de Kap114p, posiblemente dependiente de la Importina α , como sugieren los resultados obtenidos en los experimentos de afinidad.

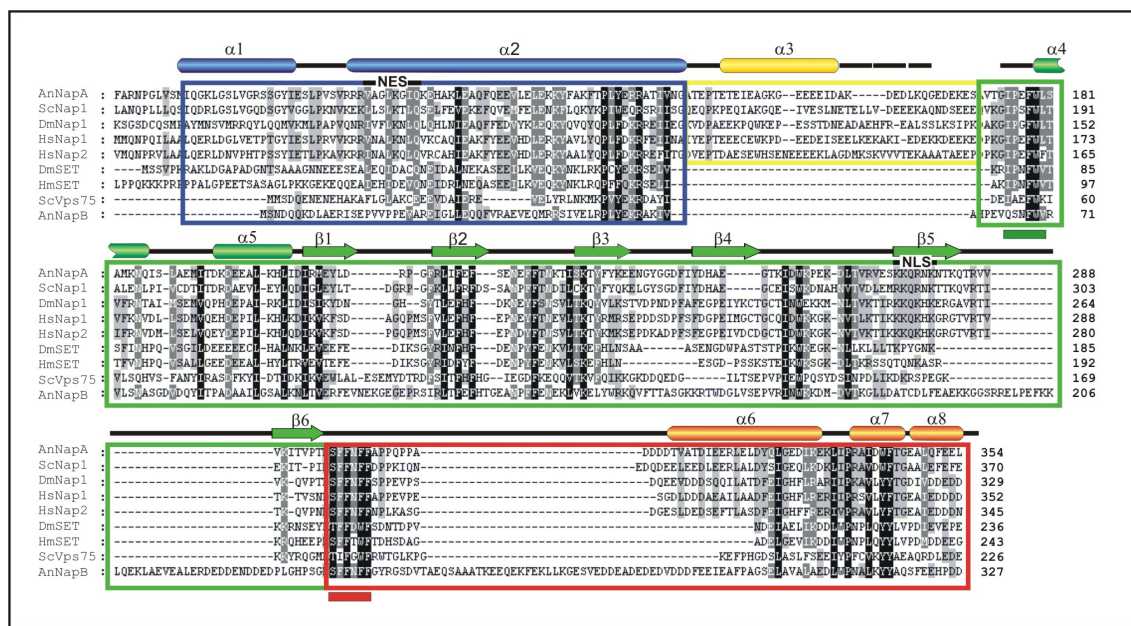


Figura II.16: Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos y organización estructural del dominio ensamblador de nucleosomas en las proteínas Nap/SET. Los elementos de la estructura secundaria fueron tomados de la estructura tridimensional de Nap1p¹⁷³. Los subdominios A (dominio I), B (dominio I), C (dominio II) y D (dominio II) se muestran en azul, amarillo, verde y rojo, respectivamente. En la parte superior del alineamiento se muestra la putativa estructura secundaria siguiendo el código de color de los subdominios. Los rectángulos redondeados y las flechas indican las hélices α y las hojas β , respectivamente. Los residuos totalmente conservados (según BLOSUM62) están sombreados en negro. Los residuos sombreados en gris oscuro y gris claro están conservados un 80% y un 60%, respectivamente. También se indican los residuos que forman la NLS y la NES de Nap1p. Los motivos conservados IPSWLT y SFFNFFDPP involucrados en la estabilidad de Nap1p (ver¹⁷³) están subrayados con una barra verde y roja, respectivamente. Los números de acceso de las proteínas son: NapA de *A. nidulans* (AnNapA), GeneBank EF592166; Nap1p de *S. cerevisiae* (ScNap1), GeneBank AAT92796; NAP1 de *Drosophila melanogaster* (DmNap1), GeneBank AAB07898; HsNap1 y HsNap2 de *Homo sapiens*, GeneBank AAH02387 y AAH22090, respectivamente; ortólogo de la proteína SET de *D. melanogaster* (DmSET), GeneBank AAF55155; HsSET de *H. sapiens*, GeneBank AAH32749; Vps75p de *S. cerevisiae* (ScVps75), GeneBank NP_014153; y NapB de *A. nidulans* (AnNapB), GeneBank AAY46520. A la derecha del alineamiento se indican las coordenadas de los aminoácidos para cada proteína.

4.2.2 NapB interacciona específicamente con KapA.

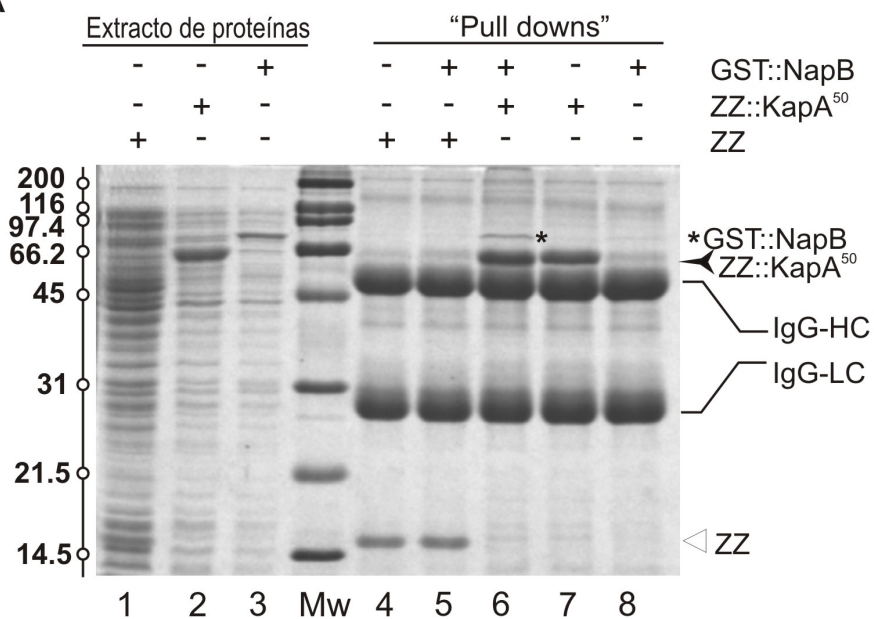
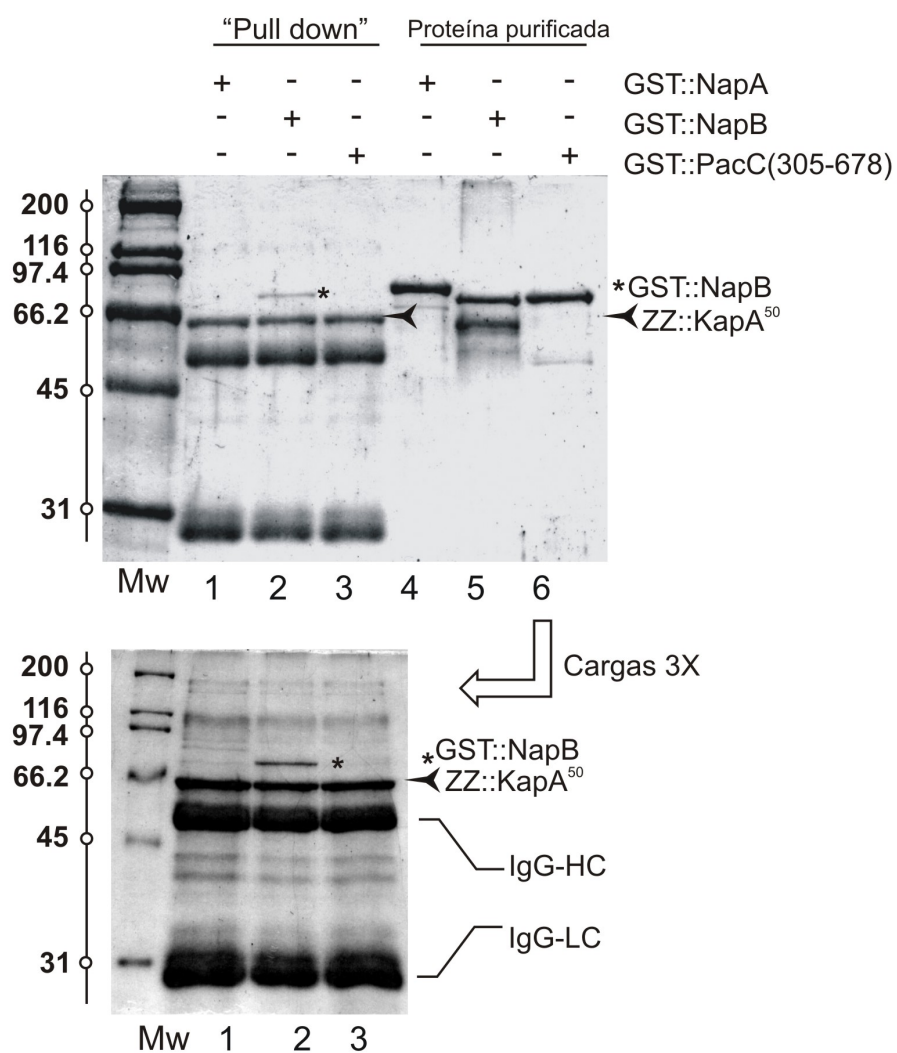
Para estudiar en detalle la interacción observada entre NapB y KapA en los ensayos de afinidad, se realizó un experimento de “pull-down” con proteínas expresadas en *E. coli*. Para ello se expresó NapB fusionada a GST (Glutation-S-transferasa) y se utilizó de nuevo la versión truncada de la Importina α fusionada a los dominio ZZ (ZZ::KapA⁵⁰). Como era de esperar, cuando se incubaron extractos de células de *E. coli* que expresaban bien GST::NapB o bien ZZ::KapA⁵⁰ con una matriz de IgG-sefarosa sólo quedó retenida la importina (Fig. II.17A, líneas 7 y 8). Cuando ambos extractos fueron incubados conjuntamente, GST::NapB fue retenido por la matriz cargada con ZZ::KapA⁵⁰, no observándose el mismo resultado al incubar GST::NapB con una matriz cargada con el polipéptido ZZ (Fig. II.17A, línea 5 comparada con 6). Cuando en lugar de utilizar ZZ::KapA⁵⁰ como cebo se utilizó GST::NapB unido a una matriz de Glutation-sefarosa se obtuvo el mismo resultado quedando la importina retenida en la matriz cargada con GST::NapB pero no en la matriz cargada con GST (resultados no mostrados). Estos resultados corroboraban la interacción observada entre NapB y KapA en los experimentos de afinidad.

Para comprobar la especificidad de la interacción se realizó un experimento de “pull-down” en el que se utilizó ZZ::KapA⁵⁰ como cebo y proteínas purificadas expresadas en *E. coli* como presas. Además de NapB se utilizó una versión de NapA fusionada a GST y el fragmento PacC(305-678) expresado como fusión a GST. Este fragmento de PacC carece de señal de localización nuclear y no es importado al núcleo¹⁵⁵. De entre las tres proteínas ensayadas sólo GST::NapB fue retenida por la matriz cargada con ZZ::KapA⁵⁰ (Fig. II.17B). Dado que Nap1p, el ortólogo de NapA en *S. cerevisiae*, es transportado al núcleo por Kap114p y la NLS no está conservada entre proteínas Nap y SET se propuso para esta tesis que la importación nuclear de los diferentes miembros de la familia Nap/SET es llevada a cabo por diferentes transportadores o rutas de transporte.

Para verificar la hipótesis anterior se caracterizó el homólogo de Kap114p en *A. nidulans*. Mediante búsquedas tipo Blastp, utilizando la secuencia de Kap114p y la base de datos de proteínas de *A. nidulans*, se encontró una proteína hipotética codificada por el locus AN2163.3 con un 43% de similitud con Kap114p. Este gen, cuya región codificante carece de intrones, ha sido denominado *kapG*. Para comprobar si NapA interaccionaba con el homólogo de Kap114p en *A. nidulans*, se realizó un experimento de “pull-down” en el que se utilizó la matriz de Glutation-sefarosa cargada con

GST::NapA, GST::NapB o GST y se incubó, en cada caso, con proteína KapG expresada *in vitro* mediante el sistema de TNT. Como controles del experimento se utilizaron KapA⁵⁰ y KapB, ambas también expresadas *in vitro*. El homólogo de KapB en *S. cerevisiae*, Kap95p, es incapaz de interaccionar con Nap1p y por lo tanto constituía el control negativo del experimento. Como se esperaba, no se detectó interacción entre la Importina β 1, KapB, y las dos “nucleosome assembly proteins”. Tampoco se detectó interacción entre NapA y KapA mientras que, de nuevo, se pudo detectar la interacción entre NapB y KapA. Sin embargo, no fue posible detectar interacción entre NapA y KapG (Fig. II.18), incluso cuando se utilizaron las mismas condiciones experimentales en las que se había descrito la interacción entre Nap1p y Kap114p¹⁷¹. La ausencia de interacción entre NapB y los transportadores KapB y KapG confirmaba la interacción específica entre NapB y KapA. La ausencia de interacción entre KapG y NapA sugiere que en *A. nidulans* la maquinaria de transporte nuclear implicada en la importación del homólogo de Nap1p puede ser diferente a la descrita en la levadura.

Figura II.17: KapA interacciona con NapB en experimentos de “pull-down”. **A)** Tinción con Coomassie de un gel de poliacrilamida al 12% en el que se pueden observar los diferentes extractos de *E. coli* utilizados (líneas 1 a 3) y el resultado de los ensayos de “pull-down” (líneas 4 a 8). Línea 1, extracto procedente de células que expresaban el polipéptido ZZ; línea 2, extracto procedente de células que expresan ZZ::KapA⁵⁰; línea 3, extracto procedente de células que expresan GST::NapB; línea 4, “pull-down” en el que se incubó el extracto de ZZ con la matriz de IgG sefarosa; línea 5, “pull-down” en el que se incubó una mezcla de los extractos de ZZ y GST::NapB con la matriz de IgG sefarosa; línea 6, “pull-down” en el que se incubó una mezcla de los extractos de ZZ::KapA⁵⁰ y GST::NapB; línea 7, “pull-down” en el que se incubó el extracto de ZZ::KapA⁵⁰ con la matriz de IgG sefarosa; línea 8, “pull-down” en el que se incubó el extracto de GST::NapB con la matriz de IgG sefarosa. **B)** Ensayo de “pull-down” en el que se muestra la interacción entre KapA⁵⁰ y NapB utilizando matriz de IgG sefarosa cargada con KapA⁵⁰ y proteínas purificadas fusionadas a GST. Líneas 4, 5 y 6 contienen 1/10 de la cantidad total utilizada de proteínas GST::NapA, GST::NapB y GST::PacC(305-678), respectivamente. Línea 1, resultado del “pull-down” utilizando GST::NapA; línea 2, resultado del “pull-down” utilizando GST::NapB; línea 3, resultado del “pull-down” utilizando GST::PacC(305-678). Gel inferior, similar al anterior pero con una carga tres veces superior. A la izquierda de los geles se indican los pesos moleculares del marcador utilizado, en kDa.

A**B**

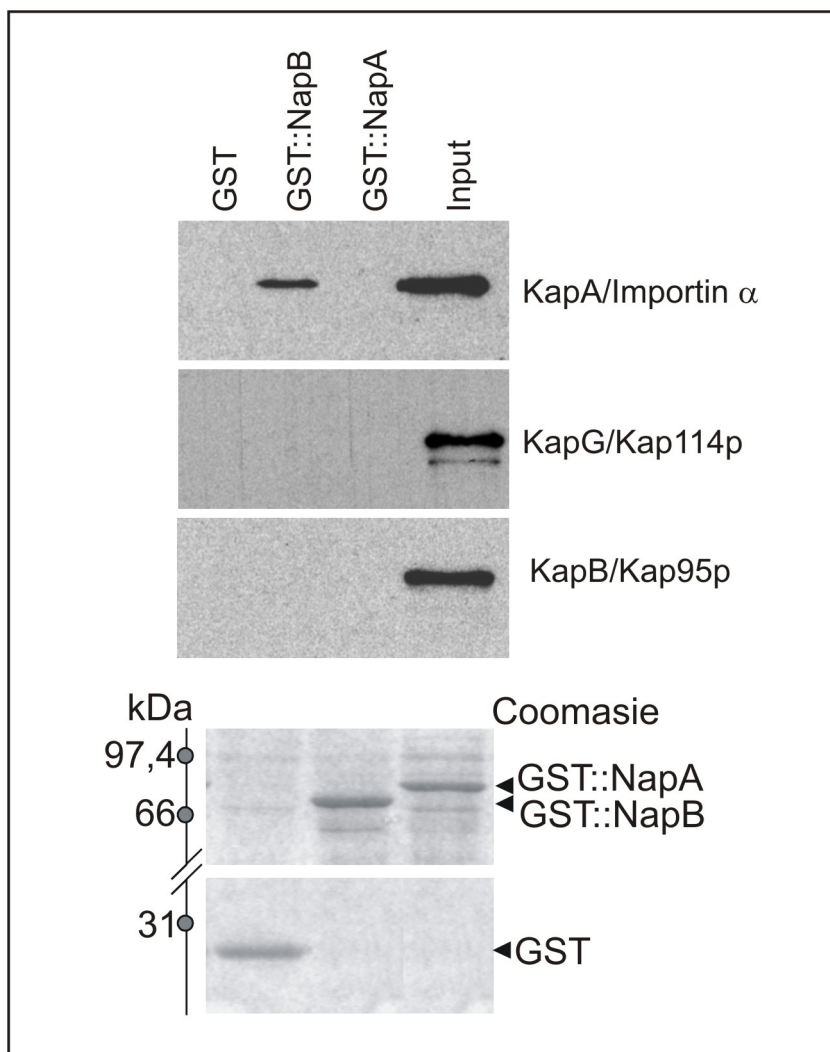
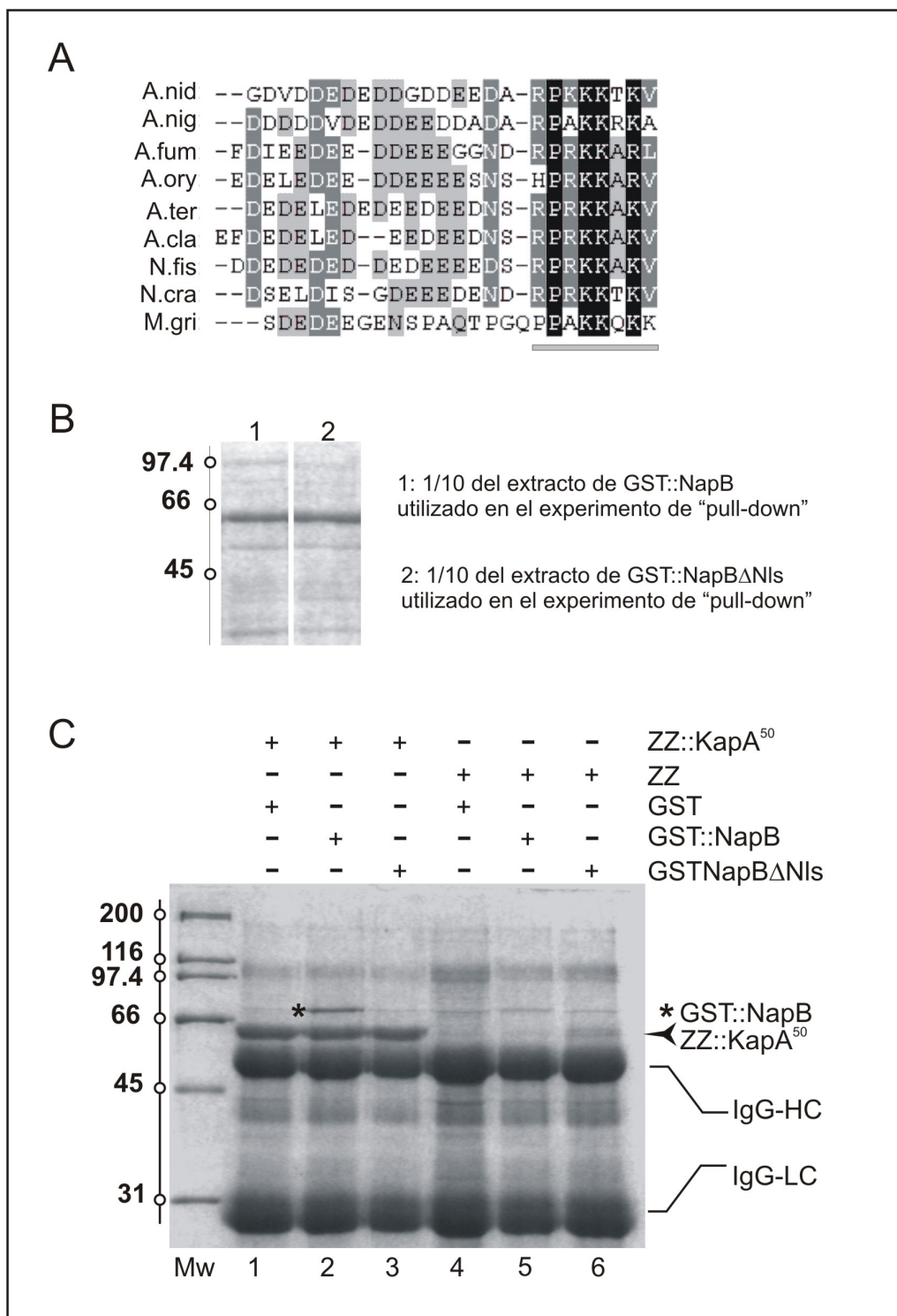


Figura II.18: KapG, el homólogo de Kap114p en *A. nidulans*, no interacciona ni con NapA ni con NapB. Proteínas GST, GST::NapA y GST::NapB inmovilizadas en una matriz de Glutation sefarosa fueron incubadas con KapA⁵⁰, KapG y KapB expresadas *in vitro*, siguiendo el procedimiento descrito en la referencia ¹⁷¹. El “input” corresponde a 1/3 de la cantidad total utilizada de cada una de las proteínas expresadas *in vitro*. En la parte inferior se muestra el gel teñido con Coomasie en el que se pueden observar cada una de las proteínas fusionadas a GST. A la izquierda se indican los pesos moleculares, en kDa, del marcador utilizado.

Figura II.19: La NLS de NapB está implicada en la interacción con KapA. A) Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los posibles homólogos de NapB en otros hongos. La posible NLS monopartita está muy conservada en todos ellos. B) Gel donde se muestra 1/10 de la cantidad utilizada de extracto de GST::NapB y GST::NapB Δ nls. C) Experimento de “pull-down”. Líneas 1, 2 y 3, resultado de los “pull-down” en los que se incubó extracto de ZZ::KapA⁵⁰ con extracto de GST, GST::NapB y GST::NapB Δ NLS, respectivamente. Líneas 4, 5 y 6, resultado de los “pull-down” en los que se incubó extracto de ZZ con extracto de GST, GST::NapB y GST::NapB Δ NLS, respectivamente. A la izquierda se indican los pesos moleculares, en kDa, del marcador utilizado.



4.2.3 La interacción entre NapB y KapA se produce a través de la NLS monopartita de NapB.

La comparación de las secuencias de aminoácidos de NapA y NapB con Nap1p muestra la existencia de diferencias significativas en la presencia y conservación de las regiones donde se localizan las putativas NLS y NES de NapA (Fig. II.15). El

alineamiento de los posibles homólogos de NapB en otros hongos muestra la presencia de una secuencia de aminoácidos en su extremo C-terminal que se ajusta muy bien a una clásica NLS monopartita (Fig. II.19A). Este tipo de NLSs son reconocidas por la Importina α y por lo tanto se procedió a verificar si dicha región estaba implicada en la interacción observada entre NapB y KapA. Para ello, se generó un fragmento de NapB que carecía de los últimos siete residuos (PRKKAKV). Mediante técnicas de PCR se amplificó una región de la secuencia codificante de *napB* con la pareja de oligonucleótidos Nap1 y NapB Δ nl (ver tabla 2) y se introdujo en el plásmido pGEX-2T para poder expresar la proteína NapB truncada fusionada a GST.

En el experimento de interacción se utilizó matriz de IgG-sefarosa que fue incubada con extractos de proteínas expresadas en *E. coli*. El extracto de proteínas de la cepa de *E. coli* que expresó ZZ::KapA⁵⁰ fue incubado con extractos en los que se había sobreexpresado GST, GST::NapB o GST::NapB Δ nl, respectivamente (Fig. II.19B). Como se muestra en la figura II.19C en la matriz de IgG-sefarosa quedó retenida la Importina α así como la forma GST::NapB (línea 2), pero no la versión truncada de NapB que carecía de la putativa NLS (línea 3). Como control negativo se utilizó un extracto del polipéptido ZZ que fue incubado con la misma cantidad de extracto de GST, GST::NapB y GST::NapB Δ nl que el extracto de ZZ::KapA⁵⁰ (líneas 4, 5 y 6). Estos resultados muestran que la interacción entre NapB y la Importina α se produce a través de la putativa NLS monopartita de NapB.

4.2.4. NapB y la ciclina NimE compiten *in vitro* por la unión con la Importina α .

Los miembros de la familia Nap/SET han sido previamente descritos como proteínas capaces de interactuar con ciclinas tipo B^{168,174}. Este hecho hizo pensar en la posibilidad de que una de las funciones de NapB pudiera ser la de ayudar a la Importina α a llevar a cabo la importación nuclear de dichas ciclinas. En *A. nidulans* se ha caracterizado sólo una ciclina tipo B y ha sido denominada NimE¹⁷⁵. Con el fin de verificar esta hipótesis se decidió estudiar la posible interacción entre NimE y KapA así como entre NimE y las proteínas Naps.

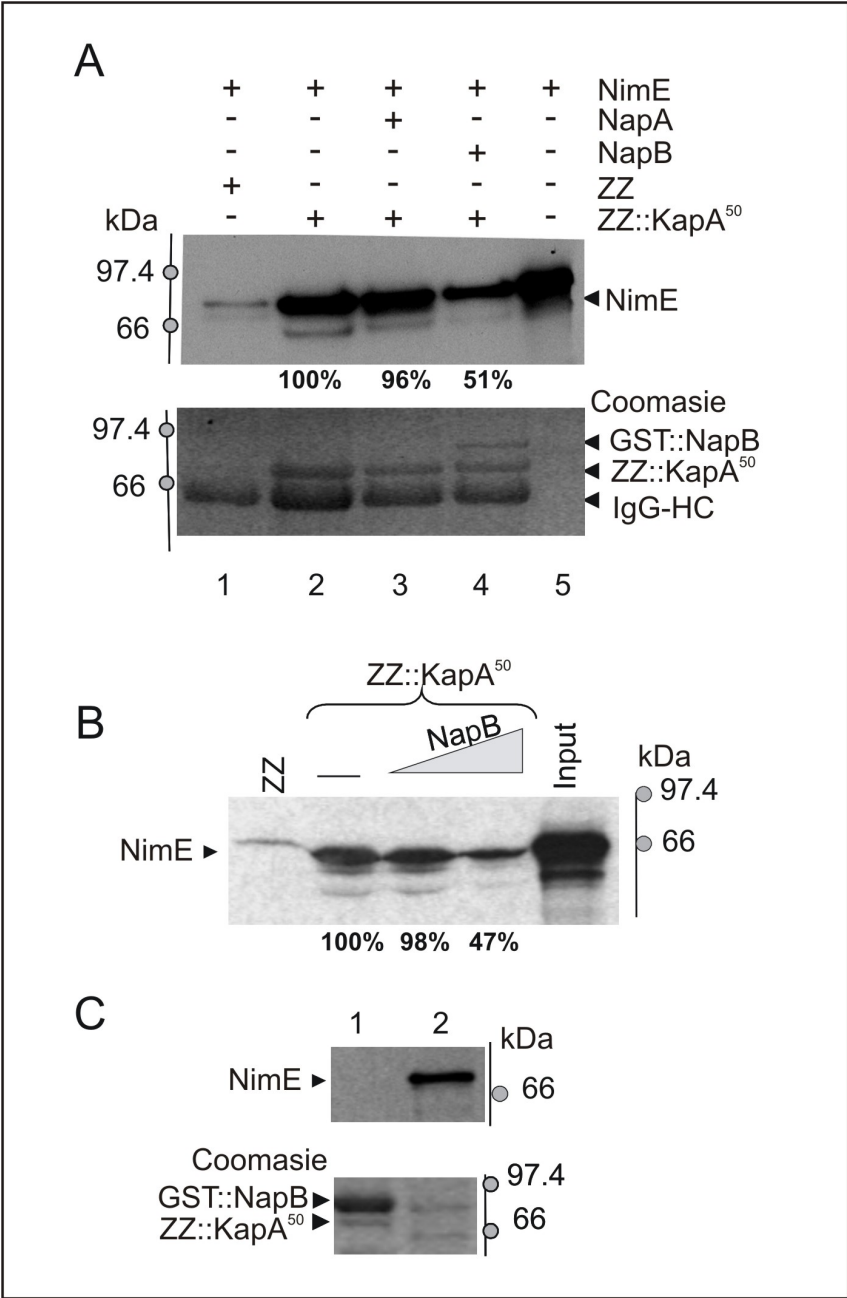


Figura II.20: KapA interacciona *in vitro* con NimE. **A)** Matriz de IgG sefarosa precargada con ZZ (línea 1) o ZZ::KapA⁵⁰ (línea 2 a 4), fue incubada con proteína NimE expresada *in vitro* y se analizó el efecto de la adición de GST::NapA (línea 3) o GST::NapB (línea 4) en la interacción de NimE con KapA. Los porcentajes indican la intensidad de la banda correspondiente a NimE, considerando el 100% la intensidad de banda observada en la línea 2. En la parte inferior se muestra el gel teñido con Coomassie. **B)** NapB y NimE compiten por la unión a KapA. Para comprobar el efecto de NapB en la interacción de NimE con KapA se añadieron 20µl y 100µl de extracto de células de *E. coli* que expresaban GST::NapB a la mezcla de reacción. En la parte inferior del gel se muestran los porcentajes de la intensidad de banda de NimE. **C)** Experimento de “pull-down” en el que una matriz de Glutation sefarosa precargada con GST::NapB fue incubada con extracto de ZZ::KapA⁵⁰ y proteína NimE expresada *in vitro* (línea 1). La línea 2 corresponde a 1/3 de la cantidad de proteína NimE utilizada. En la parte inferior se muestra el gel teñido con Coomassie.

La ciclina NimE fue expresada *in vitro* mediante el sistema de TNT. Para ello su cDNA fue introducido en el plásmido pC20, una versión modificada del plásmido pET-19b (Novagen) que carece del epítipo de 10 histidinas y permite expresar proteínas *in vitro*. Para analizar la posible interacción entre la Importina α y la ciclina B, la proteína NimE radiactiva fue incubada con una matriz de IgG-sefarosa precargada con ZZ::KapA⁵⁰ o con ZZ. Como se muestra en la figura II.20A, NimE fue retenida por ZZ::KapA⁵⁰ a pesar de que en su secuencia de aminoácidos no es posible identificar ninguna NLS clásica. Sin embargo, no se detectó interacción en experimentos de “pull-down” entre NimE y las proteínas GST::NapA y GST::NapB, resultados que contrastaban con los descritos previamente en otros organismos. A pesar de la falta de interacción directa entre NapB y NimE era aún posible que NapB tuviera un papel positivo en la importación nuclear de NimE llevada a cabo por KapA. Debido a ello, se decidió realizar un experimento de “pull-down” entre ZZ::KapA⁵⁰ y NimE en presencia de GST::NapB o de GST::NapA. La presencia de NapA no causó ningún efecto en la interacción KapA-NimE, sin embargo, la presencia de GST::NapB en el experimento de “pull-down” provocó una disminución en la cantidad de proteína NimE retenida por ZZ::KapA⁵⁰ (comparar en Fig. II.20A, líneas 3 y 4). Estos resultados sugerían que, *in vitro*, ni NapA ni NapB ayudaban a formar un complejo entre KapA y NimE, sino que NimE y NapB competían por la unión con KapA. Para confirmar los resultados obtenidos se realizaron experimentos de “pull-down” en los que se añadieron cantidades crecientes de la proteína de fusión GST::NapB observándose que cuanto mayor era la concentración de NapB menor era la cantidad de NimE retenida por ZZ::KapA⁵⁰ (Fig. II.20B). Adicionalmente se realizó un experimento de “pull-down” en el que una matriz de glutation-sefarosa cargada con GST::NapB fue incubada con una mezcla de NimE radiactiva y ZZ::KapA⁵⁰. En este experimento quedó retenida la proteína de fusión ZZ::KapA⁵⁰ pero no NimE (Fig. II.20C), lo que confirmaba la falta de formación *in vitro* de un complejo heterotrimérico NapB-KapA-NimE.

El conjunto de estos resultados pone de manifiesto que la ciclina tipo B NimE es otro cargo putativo de KapA y que las proteínas tipo Nap/SET de *A. nidulans* no son capaces de interaccionar *in vitro* con dicha ciclina así como de ayudar a la Importina α en el reconocimiento y/o unión de NimE. De hecho, se concluye que la interacción entre KapA y las proteínas NimE y NapB debe ocurrir a través de sus respectivas NLSs y las

regiones en la importina que se precisan para ello, o que NimE interaccione con una región en la Importina α próxima al dominio de interacción con las NLSs.

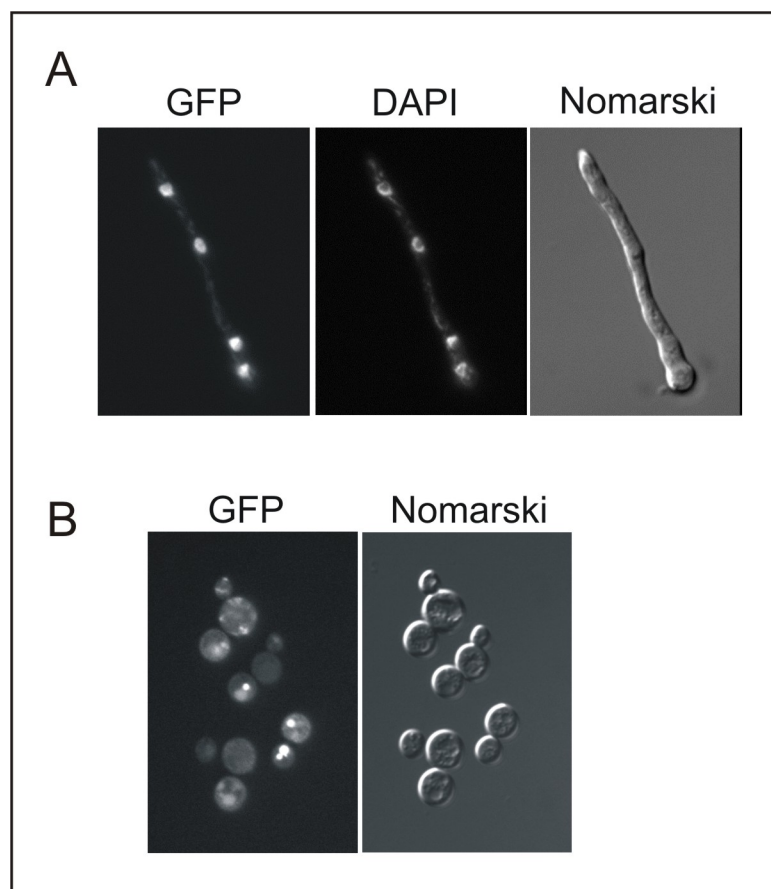


Figura II.21: Localización subcelular de NapB. A) NapB::GFP muestra una localización nuclear en interfase (GFP). Los núcleos se visualizan mediante tinción con DAPI. B) La proteína GFP::NapB expresada en levadura mostró una localización citoplásmica y vacuolar.

4.2.5. NapB es nuclear en interfase y citoplásmica durante mitosis.

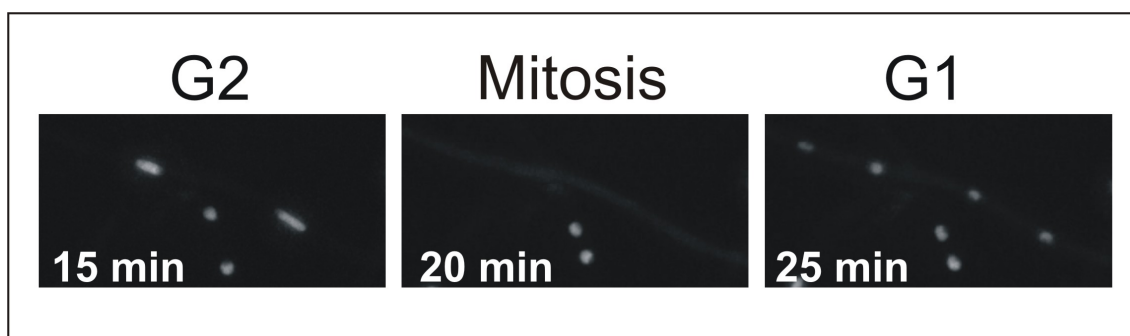
Dada la ya demostrada interacción entre NapB y la Importina α se decidió continuar el estudio de esta proteína de la familia Nap/SET analizando su localización subcelular. Para ello se generó una cepa que expresaba la proteína quimérica NapB::GFP. Siguiendo el protocolo de Yang *et al.* ⁶⁷ se generó, mediante PCR de fusión, una construcción *napB::gfp::pyrG^{A.fum}* con la que se transformó la cepa MAD1425, portadora de la mutación *pyrG89* y, por tanto, auxótrofa para pirimidina. Los transformantes obtenidos fueron analizados por Southern-blot para comprobar que se había producido el correcto reemplazamiento del *locus* silvestre por la construcción generada. El análisis con el microscopio de epifluorescencia de los transformantes

reveló que la proteína NapB::GFP se localizaba mayoritariamente en el interior del núcleo (Fig. II.21A).

En trabajos anteriores realizados en el laboratorio se había utilizado *S. cerevisiae* como organismo modelo para demostrar el papel fisiológico de la Importina α en el transporte nuclear de dos proteínas de *A. nidulans*, PacC y VeA^{62,176}. Para conocer si la Importina α de *S. cerevisiae*, Srp1p, era capaz de llevar a cabo la importación nuclear de NapB, la cepa silvestre W303-1a fue transformada con un plásmido centromérico que expresaba la proteína GFP::NapB bajo el control del promotor ADH1. A pesar de la localización nuclear observada para la proteína Vps75p etiquetada con GFP¹⁰², la proteína GFP::NapB no se localizó en el núcleo en *S. cerevisiae* (Fig. II.21B). Este hecho no es aislado dado que se ha comprobado en el laboratorio que la NLS localizada en el dedo de zinc de PacC tampoco es funcional en *S. cerevisiae*⁶². Por lo tanto una posible explicación de los anteriores resultados podría ser la falta de funcionalidad de la NLS de NapB en la levadura. Además, la falta de interacción entre el homólogo de Kap114p, KapG, y NapB o NapA, ponen de manifiesto que deben existir importantes diferencias en los mecanismos implicados en el transporte de estas proteínas en *A. nidulans* y *S. cerevisiae*.

Una vez determinada la localización subcelular de NapB en núcleos interfásicos de *Aspergillus*, era interesante abordar el estudio de la localización subcelular de esta proteína durante mitosis dada su posible relación con la organización de la cromatina. Como se observa en la figura II.22 y en el vídeo 9 asociado a ella, al inicio de la mitosis se produjo una disminución en los niveles de fluorescencia nuclear lo que indicaba que parte de la proteína estaba saliendo del nucleoplasma al citoplasma. Una vez terminada la mitosis, cuando se recuperaron los procesos de transporte activo (ver secciones anteriores e Introducción General), NapB::GFP volvió a localizarse en el interior de los dos núcleos hijos. La pérdida de la localización nuclear de NapB durante la mitosis podría facilitar una posible función de esta proteína en el citoplasma, como ha sido demostrado en su homólogo de *S. cerevisiae*, Vps75p¹⁶⁶.

Figura II.22: Localización subcelular de NapB durante la mitosis. Serie de imágenes tomadas del vídeo 9 en las que se puede ver que la localización nuclear de NapB en G2 se pierde durante la mitosis y se recupera una vez finalizado el proceso de división nuclear. Se indica el tiempo en minutos.



4.2.6 Mecanismos implicados en la regulación de la localización nuclear de NapB.

La localización nuclear que presenta NapB durante la interfase parecía ser la consecuencia de su importación nuclear por parte de KapA, ya que como se ha demostrado anteriormente ambas proteínas interaccionan de manera específica. Con el fin de verificar esta hipótesis se decidió analizar el efecto del mutante *kapA31* en la localización subcelular de NapB, ya que como se ha demostrado en el apartado 2.2 dicho mutante produce un defecto en la importación nuclear de la proteína quimérica NLS::GFP. Para ello se generó mediante cruzamiento génico una cepa que expresaba la proteína NapB::GFP en un fondo genético *kapA31*. Dado el carácter termosensible de la mutación *kapA31*, conidiosporas de una cepa *napB::gfp* silvestre y otra *napB::gfp, kapA31* fueron germinadas a 25°C y después transferidas a la temperatura restrictiva de 42°C. La observación de las muestras al microscopio no mostró una diferencia significativa en la localización subcelular de NapB::GFP entre ambas cepas, observándose niveles similares de fluorescencia tanto en el núcleo como en el citoplasma en todas las fases del ciclo celular (Fig. II.23A). Estos resultados mostraban que la localización nuclear de NapB se mantenía aún en presencia de una forma mutante de la Importina α por lo que se podría pensar en una ruta alternativa de transporte llevada a cabo por otro transportador. Sin embargo, tampoco se podía descartar la posibilidad de que la mutación no mostrase fenotipo alguno en las condiciones de cultivo utilizadas ya que se han observado diferencias significativas en el grado de termosensibilidad de las cepas portadoras del alelo *kapA31* en diferentes medios de cultivo.

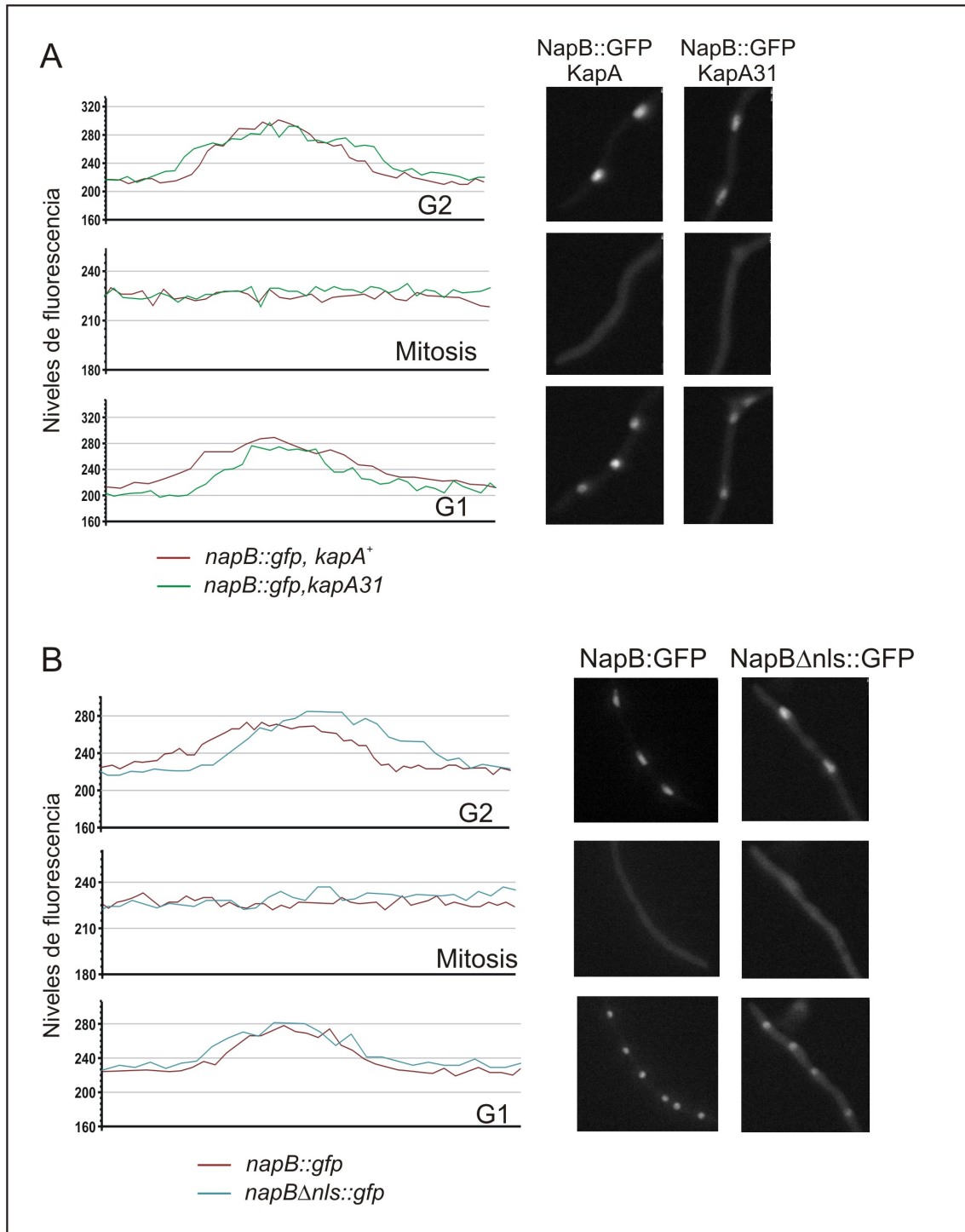


Figura II.23: Efecto de KapA31 y la ausencia de la NLS en la localización nuclear de NapB. **A)** Efecto del alelo *kapA31* en la localización subcelular de NapB. Los gráficos muestran los niveles de fluorescencia del núcleo y del citoplasma en cada uno de los momentos del ciclo celular, en las dos cepas analizadas. A la derecha se muestra una foto representativa de cada caso. **B)** Igual que en A pero comparando la localización subcelular de NapB::GFP con NapBΔnls::GFP. Las medidas corresponden a la intensidad de los píxeles situados a lo largo de una línea virtual que atraviesa longitudinalmente la zona donde se sitúa el núcleo en cada imagen.

A la vista de estos resultados se decidió abordar el análisis de la localización subcelular de NapB alterando directamente la proteína en lugar del transportador. Los resultados obtenidos en los experimentos de “pull-down” han demostrado que la NLS del extremo C-terminal de NapB es necesaria para que se produzca la interacción con KapA. Por tanto, se decidió analizar la localización subcelular de una versión de NapB que careciera de esta NLS. Para ello, se generó una cepa que expresaba la proteína quimérica NapB Δ nls::GFP. Siguiendo el protocolo de Yang *et al.*⁶⁷ se reemplazó la región codificante del *locus napB* por la construcción *nap Δ nls::gfp::pyrG^{A.fum}* generada mediante PCR de fusión y los transformantes obtenidos fueron analizados por Southern-blot para verificar que se había producido un correcto reemplazamiento génico. El análisis al microscopio de la nueva cepa generada reveló que la proteína NapB Δ nls::GFP mostraba la misma localización subcelular que NapB::GFP, tanto en interfase como durante mitosis, observándose niveles de fluorescencia similares en todos los casos (Fig. II.23B). Estos resultados demostraban que la ausencia de la posible NLS de NapB no afectaba a su localización nuclear lo que podía ser debido a que la importación nuclear de NapB implicara otras regiones de la proteína o a que dicha localización nuclear no dependiera de la existencia de procesos de transporte activo, lo que explicaría también los resultados obtenidos con el mutante *kapA31*.

Con el fin de averiguar si la localización nuclear de NapB en interfase era dependiente de los procesos de transporte activo se decidió analizar la localización subcelular de la proteína en condiciones de ausencia de energía. Para ello se trató un cultivo de la cepa que expresa NapB::GFP con una mezcla de azida y fluoruro sódico y tras 10-15 minutos de incubación se procedió a observar las muestras al microscopio. La preferente localización nuclear de NapB::GFP en interfase no se vio afectada por la ausencia de procesos dependientes de energía en la célula (Fig. II.24A), lo que sugería que NapB estaba siendo retenido en el núcleo, posiblemente por su capacidad de interaccionar con la cromatina. Como controles del experimento se analizaron una cepa que expresa la forma PacC27, capaz de interaccionar con el DNA, una cepa que expresa la forma mutante de este factor transcripcional, Pro138Phe PacC27, incapaz de unirse al DNA, así como la localización de la nucleoporina Nic96::GFP. En el caso de PacC27, la ausencia de energía no afectó su localización preferentemente nuclear gracias a su capacidad de unión al DNA (Fig. II.24B). Por el contrario, la forma mutante de PacC27 no pudo ser retenida en el núcleo en ausencia de procesos de transporte activo (Fig.

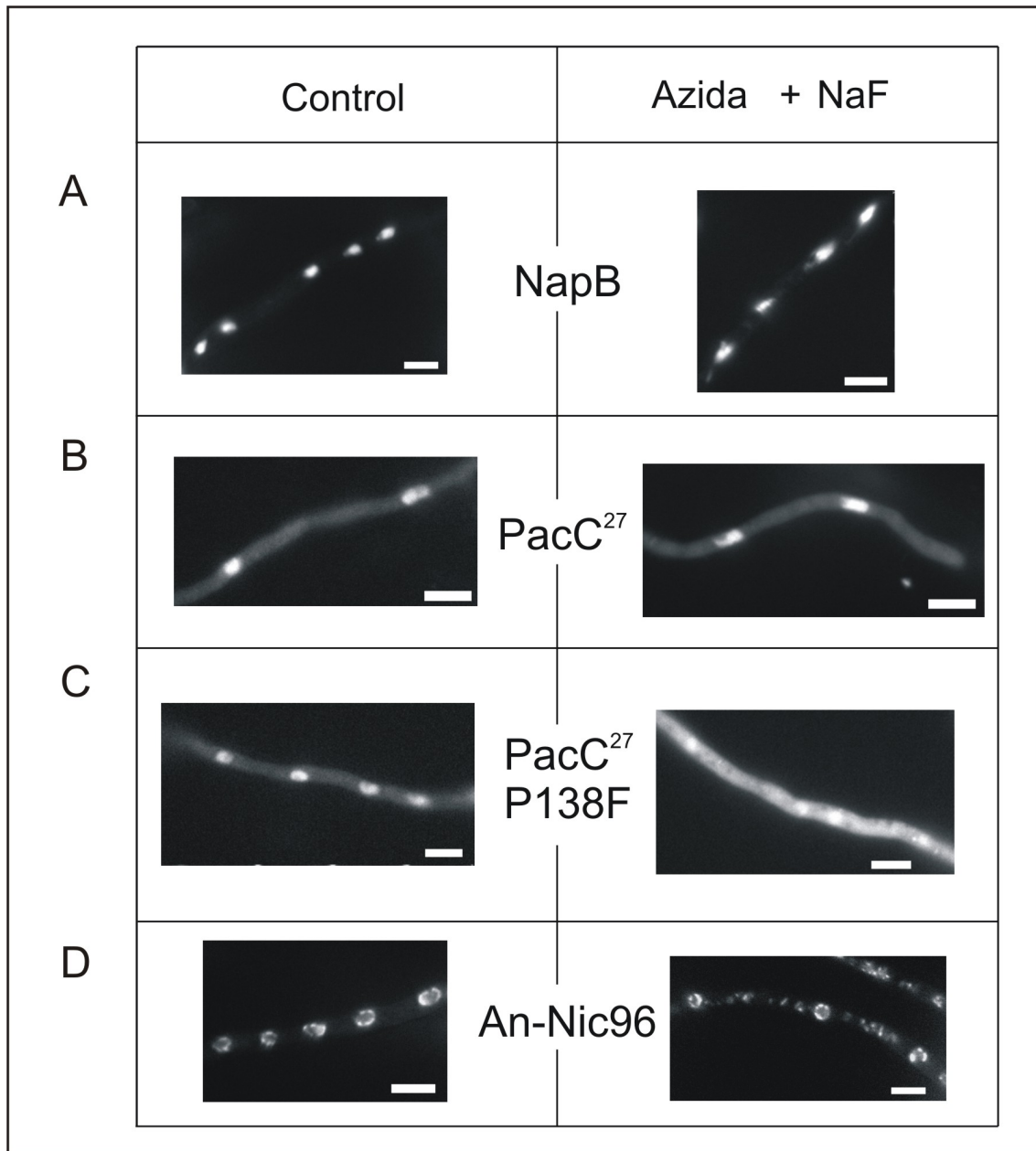


Figura II.24: Efecto de la falta de energía en la localización subcelular de NapB. Células que expresaban las diferentes proteínas de fusión indicadas fueron incubadas en medio con una mezcla de azida (15mM) y NaF (15mM) y se examinó la localización subcelular de las proteínas fluorescentes. **A)** La localización de NapB::GFP no se vio afectada por el tratamiento. **B)** Localización subcelular de la proteína quimérica GFP::PacC²⁷. **C)** Pérdida de la localización subcelular en el mutante de PacC que es incapaz de unirse al DNA. **D)** Localización subcelular de la nucleoporina AnNic96::GFP.

II.24C). La localización perinuclear de Nic96::GFP tampoco se vio afectada en presencia de la mezcla de azida y NaF (Fig. II.24D). Esta nucleoporina pierde su localización perinuclear durante la mitosis cuando se produce el desensamblaje del poro nuclear¹⁰⁰, sin embargo, su localización durante la interfase fue independiente de

energía, lo que demostraba que es el desensamblaje del poro nuclear lo que conduce a la pérdida de los procesos de transporte activo y no a la inversa.

El conjunto de estos resultados sugieren que durante la interfase la localización nuclear de NapB dependería de su capacidad de interactuar con elementos nucleares y, durante la mitosis, se deberían producir cambios postraduccionales que prevendrían la retención de NapB en el interior del núcleo, de forma adicional a la pérdida de los procesos de importación nuclear.

4.3. Velvet, VeA: la proteína que regula morfogénesis en respuesta a luz es transportada por la Importina α .

En ciertos hongos existe un complejo desarrollo morfológico en respuesta a determinados factores ambientales que alteran y controlan tanto el crecimiento vegetativo como el desarrollo de estructuras específicas del ciclo de vida sexual y/o asexual del hongo. Uno de los principales factores ambientales que modulan el desarrollo y la diferenciación morfológica de *A. nidulans* es la luz. En presencia de luz se promueve la reproducción asexual del hongo con la formación de conidióforos, mientras que en la oscuridad se favorece la entrada en ciclo de reproducción sexual, dando lugar a la formación de cuerpos fructíferos denominados cleistotecios. El gen *velvet*, *veA*, es un regulador transcripcional que media la respuesta a la luz en *A. nidulans*¹⁷⁷ integrando diferentes factores transcripcionales y otros moduladores de la expresión génica^{178,179}. Mutaciones de pérdida de función en esta proteína reducen la formación de cleistotecios mientras que incrementan la producción de conidióforos tanto en luz como en oscuridad¹⁸⁰.

La mayoría de las cepas de *Aspergillus nidulans* utilizadas en los laboratorios portan el alelo mutante *veAI*, que permite la esporulación de forma independiente de la luz sin anular la entrada en ciclo sexual. El alelo *veAI* contiene una mutación puntual en el primer codón iniciador de modo que la primera metionina de la proteína VeA1 corresponde a la codificada por el codón 37 de la forma silvestre, dando lugar por lo tanto a una forma truncada por su extremo amino terminal. A pesar de que este alelo mutante se descubrió en 1965¹⁸¹, y de haberse utilizado ampliamente durante todo este tiempo, relativamente pocos esfuerzos se han realizado para comprender biológica y molecularmente el fenotipo de esta mutación.

El gen *velvet* está siendo estudiado en detalle por diferentes grupos, entre ellos el de la Dr. Ana M^a Calvo en la Universidad de Illinois. La identificación de una posible

NLS en la secuencia de aminoácidos de VeA hizo que comenzara un trabajo en estrecha colaboración con el laboratorio de la Prof. Calvo con el fin de estudiar dicha NLS y su posible relación con la maquinaria de importación nuclear de *A. nidulans*.

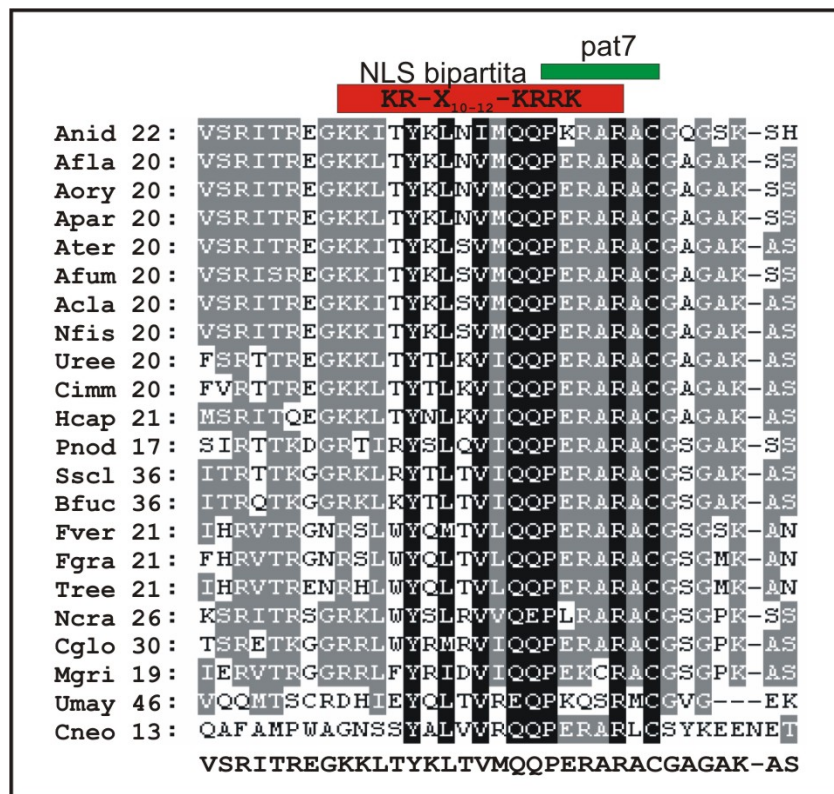


Figura II.25: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la región N-terminal de VeA de diferentes hongos. Se señalan la putativa NLS bipartita (rojo) y el motivo pat7 (verde). La secuencia consenso se muestra en la parte inferior del alineamiento. Los residuos sombreados de negro están 100% conservados y los sombreados en gris un 60%. El número situado a continuación de los nombres de los organismos indican la posición del aminoácido en cada secuencia de VeA. Anid, *A. nidulans*; Afla, *A. flavus*; Aory, *A. oryzae*; Apar, *A. parasiticus*; Ater, *A. terreus*; Afum, *A. fumigatus*; Acla, *A. clavatus*; Nfis, *Neosartorya fischeri*; Uree, *Uncinacarpus reesii*; Cimm, *Coccidioides immitis*; Hcap, *Histoplasma capsulatum*; Pnod, *Phaeosphaeria nodorum*; Sscl, *Sclerotinia sclerotiorum*; Bfuc, *Botrytinia fuckeliana*; Fver, *Fusarium verticillioides*; Fgra, *Fusarium graminearum*; Tree, *Trichoderma reesei*; Ncra, *Neorospira crassa*; Cglo, *Chaetomium globosum*; Mgri, *Magnaporthe grisea*; May, *Ustilago maydis*; Cneo, *Cryptococcus neoformans*.

4.3.1 VeA posee un putativa NLS bipartita en su región N-terminal.

La forma truncada de Velvet generada por el alelo *veA1* claramente muestra que la región N-terminal de VeA es importante para la regulación de la morfogénesis de *A. nidulans* dependiente de luz. Kim y colaboradores describieron la presencia de una putativa NLS en esta región que se ajusta a un motivo pat7. El motivo pat7 consta de una prolina seguida de tres residuos básicos (K/R) en los cuatro residuos contiguos (<http://psort.nibb.ac.jp>). La putativa NLS (PKRAR) se extiende desde el aminoácido 41

al 46, si bien la funcionalidad de este motivo no había sido investigada¹⁸⁰. El análisis mas detallado de la secuencia de VeA permitió identificar otra putativa NLS de carácter clásico y bipartita (KK-X₁₁-KRAR), estando situada entre los aminoácidos 28 y 44 (Fig. II.25). Esta NLS bipartita no se ajusta completamente a la secuencia consenso (KR-X₁₀₋₁₂-KRRK) propuesta por Fontes *et al.*^{137,148} para NLSs bipartitas por lo que la búsqueda automática no pudo detectarla. Sin embargo, esta secuencia de aminoácidos está conservada entre las proteínas VeA de diferentes especies de *Aspergillus*, principalmente el primer grupo de residuos básicos que interaccionarían con el sitio de menor afinidad de la Importina α . Esta secuencia similar a una NLS, parece conservarse, casi exclusivamente, en las proteínas VeA de las especies del género *Aspergillus* y en otros hongos filamentosos, como *Histoplasma capsulatum*, *Neosartorya fischeri*, *Uncinocarpus reesii* y *Coccidioides immitis*, estando ausente de proteínas hipotéticas VeA de otras especies y géneros de hongos filamentosos (Fig. II.25).

4.3.2 La localización subcelular de VeA es dependiente de la luz en *A. nidulans*.

Para determinar la existencia de una NLS funcional en VeA era preciso demostrar en primer lugar que VeA exhibía una preferente localización nuclear en *A. nidulans*. Para ello se generó una cepa que expresaba la proteína quimérica VeA::GFP. La región codificante del locus *veA* se reemplazó por la construcción *veA::gfp::pyrG^{A.fum}* generada mediante PCR de fusión. Dado que VeA es un regulador transcripcional dependiente de luz se decidió analizar su localización subcelular en presencia y ausencia de luz. Cuando conidiosporas de la cepa que expresa VeA::GFP fueron incubadas en presencia de luz la proteína se localizó tanto en el interior de los núcleos como en el citoplasma. Sin embargo, cuando las conidiosporas germinadas fueron incubadas en oscuridad la localización de VeA::GFP fue mayoritariamente nuclear (Fig. II.26). Por lo tanto VeA debe contener en su secuencia, tal y como se predecía, una NLS funcional.

Como la mutación *veA1* trunca la señal bipartita, siguiendo la misma estrategia de etiquetado fluorescente, se analizó la localización subcelular de la proteína VeA1. Al contrario de lo observado con VeA::GFP, la proteína mutante no mostró una localización subcelular dependiente de la luz, localizándose en el citoplasma tanto en presencia como en ausencia de luz (Fig. II.26). Estos resultados indicaban que en los 36

primeros aminoácidos de VeA debía existir una NLS funcional cuya actividad, además, parecía dependiente de luz y ponía de manifiesto que la regulación de la morfogénesis dependiente de luz implica la localización nuclear de VeA.

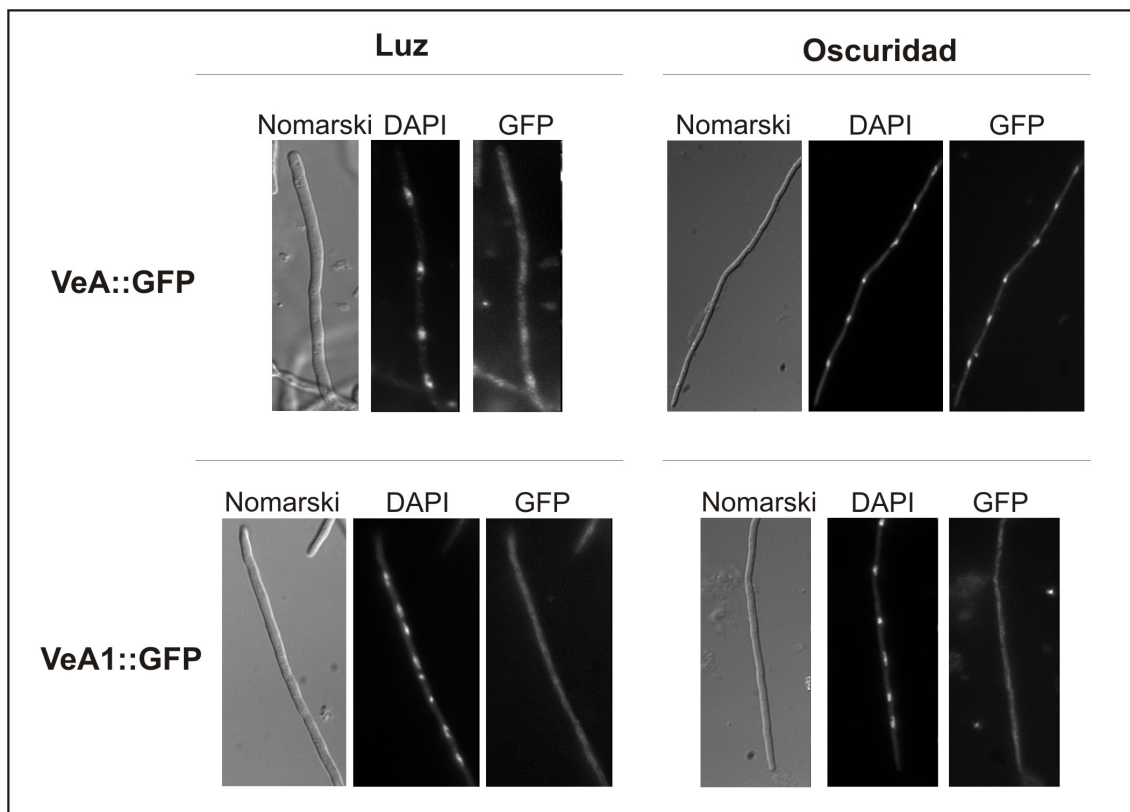


Figura II.26: Localización subcelular de VeA y VeA1 en *A. nidulans*. Conidios de las cepas que expresaban las formas VeA::GFP y VeA1::GFP fueron incubados en luz y oscuridad y analizada la localización subcelular de dichas quimeras. VeA::GFP mostró localización nuclear tan sólo en aquellas células que fueron incubadas en oscuridad. Por el contrario, la localización subcelular de VeA1::GFP fue siempre citoplásmica.

4.3.3 Análisis funcional de la NLS bipartita de VeA.

Para determinar si la NLS bipartita identificada en la región N-terminal de VeA era funcional se construyeron diferentes transgenes que expresaban formas silvestres o truncadas de *veA* fusionadas a GFP (Fig. II.27A) y que fueron expresadas en *S. cerevisiae* donde no existe homólogo para VeA ni se conoce señalización dependiente de luz. Como control se generaron las mismas proteínas pero fusionadas a la NLS monopartita del antígeno T largo de SV40. Las diferentes construcciones que expresaban: GFP::VeA, NLS_{SV40}::GFP::VeA, GFP::ΔNLS-VeA, NLS_{SV40}::GFP::ΔNLS-VeA, GFP::VeA1 o NLS_{SV40}::GFP::VeA1, fueron realizadas en plásmidos centroméricos y estos se transformaron en la cepa silvestre W303-1a, de *S. cerevisiae*. El análisis con el microscopio de fluorescencia de las cepas de levadura generadas

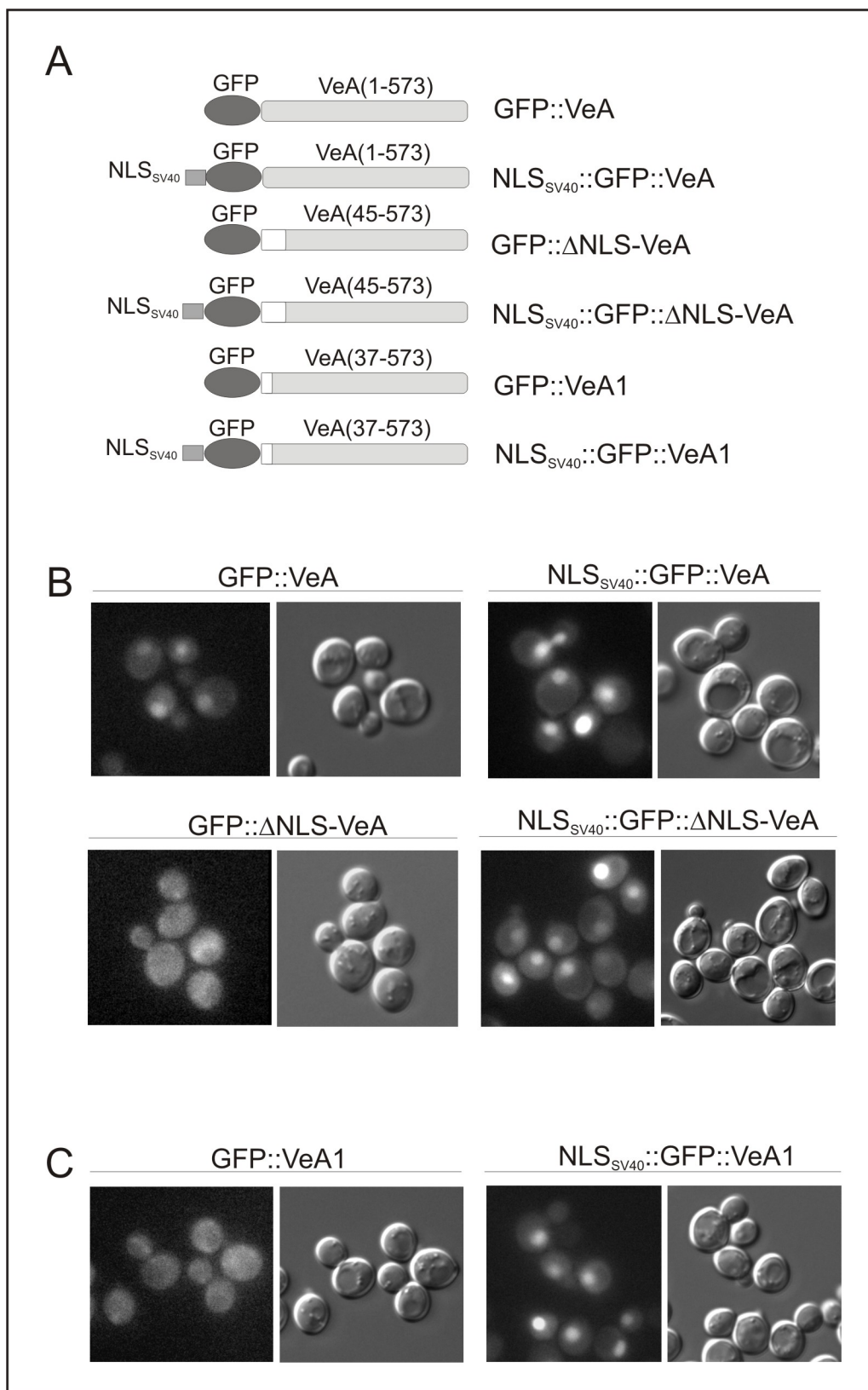


Figura II.27: La forma silvestre de VeA se localiza en el núcleo en *S. cerevisiae*. **A)** Representación esquemática de las diferentes construcciones generadas. **B y C)** Localización subcelular de las construcciones de A cuando fueron expresadas en *S. cerevisiae*. Las construcciones con la NLS de SV40 fueron utilizadas como control.

reveló que VeA se localizaba principalmente en el núcleo mientras que Δ NLS::VeA se encontraba tanto en el núcleo como en el citoplasma (Fig. II.27B). Estos resultados indicaban que la región amino terminal de VeA posee una función como NLS y que además era reconocida por la maquinaria de importación nuclear de *S. cerevisiae*. Adicionalmente, al analizar la cepa que expresaba GFP::VeA1 se observó que la fluorescencia aparecía en el citoplasma, al contrario de lo que ocurría en la cepa control que expresaba NLS_{SV40}::GFP::VeA1 (Fig. II.27C). Estos resultados sugerían que los 36 aminoácidos de los que carece la proteína mutante VeA1 son esenciales para que la proteína se localice en el interior del núcleo. Además, la NLS bipartita truncada y la putativa NLS pat7 que están presentes en VeA1 no parecen ser suficientes para el transporte de la proteína al interior del núcleo en las células de levadura.

4.3.4 KapA interacciona con VeA.

Con el fin de analizar si la NLS de VeA, reconocida por la maquinaria de importación nuclear de *S. cerevisiae*, era reconocida por la Importina α de *A. nidulans* se decidió realizar un análisis de doble híbrido entre KapA y diferentes formas de VeA (Fig. II.28A): VeA silvestre (del aminoácido 1 al 573), Δ NLS-VeA (45-573), Δ VeA (186-573) y VeA1 (37-573). El fragmento de DNA codificante para KapA⁵⁰ se introdujo en el plásmido de doble híbrido pACT2, expresándose la proteína KapA⁵⁰ fusionada al dominio de activación de Gal4p (Gal4p^{AD}-KapA⁵⁰). Los fragmentos de DNA codificantes de las diferentes versiones truncadas o silvestres de VeA se introdujeron en el plásmido pGBKT7, expresándose como formas fusionadas al dominio de unión a DNA de Gal4p (Gal4p^{DBD}-VeA). Las medidas cualitativas del gen reportero LacZ dependiente del sistema del doble híbrido en cada una de las cepas generadas indicaban que la forma silvestre (1-573) interaccionaba con KapA⁵⁰ eficientemente, mientras que Δ NLS-VeA (45-573) y VeA1 (37-573) lo hacían más débilmente.

Para confirmar los resultados obtenidos mediante doble híbrido, se decidió realizar un ensayo de interacción proteína-proteína *in vitro*. Para ello las diferentes versiones de VeA se expresaron como formas radioactivas (S³⁵-Met) *in vitro* mediante el sistema de TNT a partir de los plásmidos pGBKT7-VeA recombinantes. Como cebo en el experimento de interacción se utilizaron las proteínas ZZ::KapA⁵⁰ o ZZ unidas a IgG-sefarosa. Como se muestra en la figura II.28B, se observó interacción entre KapA⁵⁰

y la forma silvestre de VeA. También se observó, de forma congruente con los resultados obtenidos por doble híbrido, interacción entre la Importina α y las versiones truncadas Δ NLS-VeA (45-573) y VeA1 (37-573). Dado que en la construcción Δ NLS-VeA (45-573) se han eliminado las dos NLS clásicas detectadas, estos resultados sugerían que los aminoácidos comprendidos entre el residuo 45 al 186 deben colaborar a la interacción de la NLS con KapA, sin embargo su papel debe ser prescindible *in vivo*, dado que, como se mostró anteriormente, la delección parcial de la NLS bipartita en el alelo *veA1* es suficiente para comprometer la localización nuclear de VeA en *A. nidulans*.

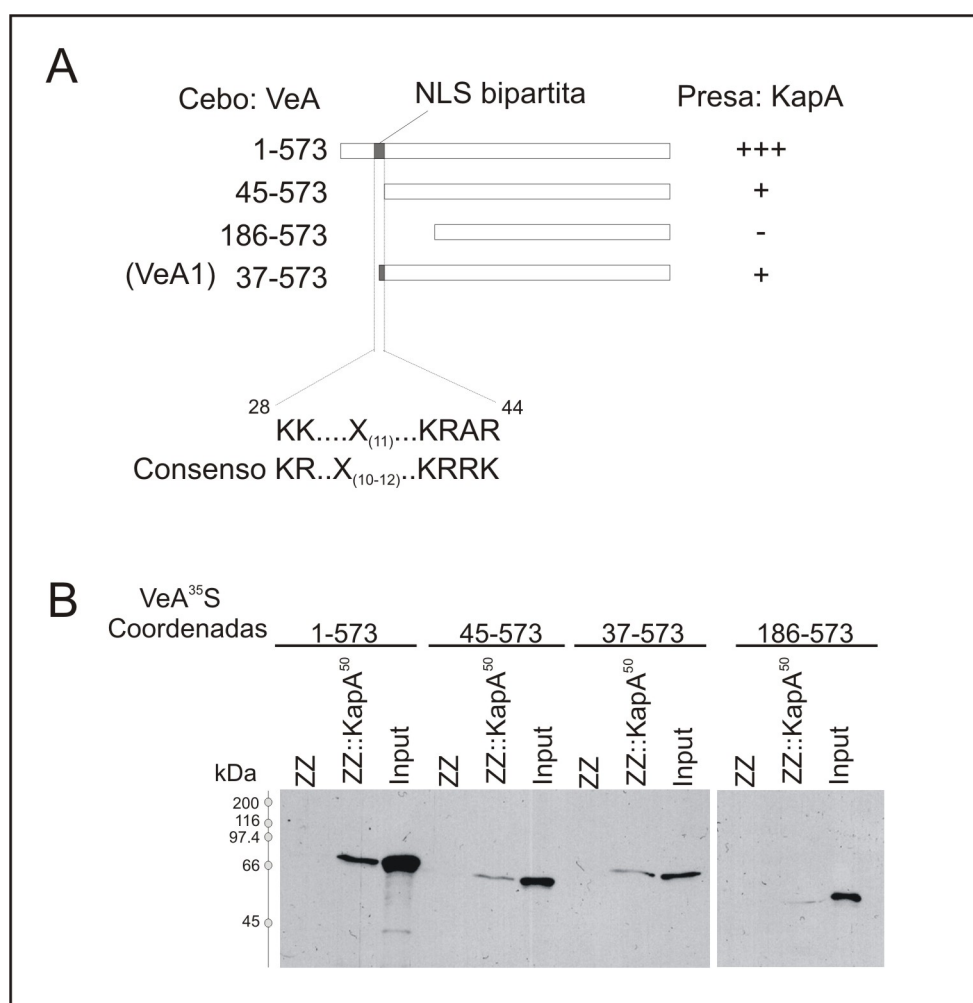


Figura II.28: La Importina α de *A. nidulans* reconoce la NLS bipartita de VeA. A) Experimento de doble híbrido en el que se utilizaron como cebo las diferentes construcciones de VeA indicadas y como presa KapA. Se muestra la secuencia de la NLS de VeA y la secuencia consenso para NLSs bipartitas. **B)** Experimentos de interacción *in vitro* entre las diferentes formas de VeA y KapA. En todos los casos los “input” corresponden a 1/5 de la cantidad total utilizada de cada una de las proteínas expresadas *in vitro*. En las líneas indicadas con ZZ, la forma correspondiente de VeA fue incubada con una matriz de IgG sefarosa precargada con ZZ; en las líneas marcadas con ZZ::KapA⁵⁰ la forma correspondiente de VeA fue incubada con una matriz de IgG sefarosa precargada con ZZ::KapA⁵⁰.

4.3.5 Estudio de la localización subcelular de VeA en fondos genéticos mutantes para la Importina α .

Una vez determinada la localización subcelular de VeA tanto en *A. nidulans* como en *S. cerevisiae*, así como demostrado que KapA es capaz de interaccionar con VeA *in vitro*, se procedió a analizar si una forma de la Importina α impedida en el transporte de sus cargas al núcleo alteraba la localización subcelular de VeA. Para ello se decidió utilizar tanto *S. cerevisiae* como *A. nidulans*. En la levadura se utilizó la cepa portadora de la forma mutante *srp1-31*, una mutación termosensible en la Importina α (Srp1p), y en *A. nidulans* se utilizó la cepa portadora del alelo mutante *kapA31* generada en este trabajo.

Como se ha mencionado en el apartado 2 de la Parte II, en *S. cerevisiae* la mutación termosensible *srp1-31* da lugar a una Importina α mutante que es incapaz de interaccionar con las NLSs a la temperatura restrictiva de 37°C. Sin embargo, a 25°C la proteína es suficientemente funcional como para promover la localización nuclear de proteínas portadoras de NLSs clásicas. En el apartado 4.3.3 se ha demostrado que la proteína quimérica GFP::VeA se localiza en el interior del núcleo en una cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Para analizar el efecto de la Importina α mutante, los plásmidos centroméricos portadores de las construcciones GFP::VeA y NLS_{SV40}::GFP::VeA se transformaron en la cepa mutante *srp1-31* de *S. cerevisiae*. Como se muestra en la figura II.29A el análisis con el microscopio de fluorescencia de las cepas de levadura generadas reveló que GFP::VeA se localizaba en el interior del núcleo a la temperatura permisiva de 25°C; sin embargo, no fue posible observar localización nuclear a temperatura restrictiva (37°C). En el caso de la cepa de levadura que expresaba la quimera NLS_{SV40}::GFP::VeA, utilizada como control del experimento, se obtuvo el mismo resultado, observándose localización nuclear a 25°C y citoplásmica a 37°C. En ambos casos, tanto GFP::VeA como NLS_{SV40}::GFP::VeA se localizaron en el interior del núcleo en una cepa silvestre crecida a 37°C (Fig II.29A). Estos resultados sugerían que la Importina α de *S. cerevisiae* es la responsable de la importación nuclear de VeA y, junto con los resultados obtenidos en el apartado 4.3.3, indicaban que la importación de VeA implica el reconocimiento de su NLS por parte de la Importina α de *S. cerevisiae*.

En el apartado 2.2 de la Parte II se ha demostrado que la Importina α mutante de *A. nidulans*, KapA31, causa un defecto en la importación nuclear de la quimera

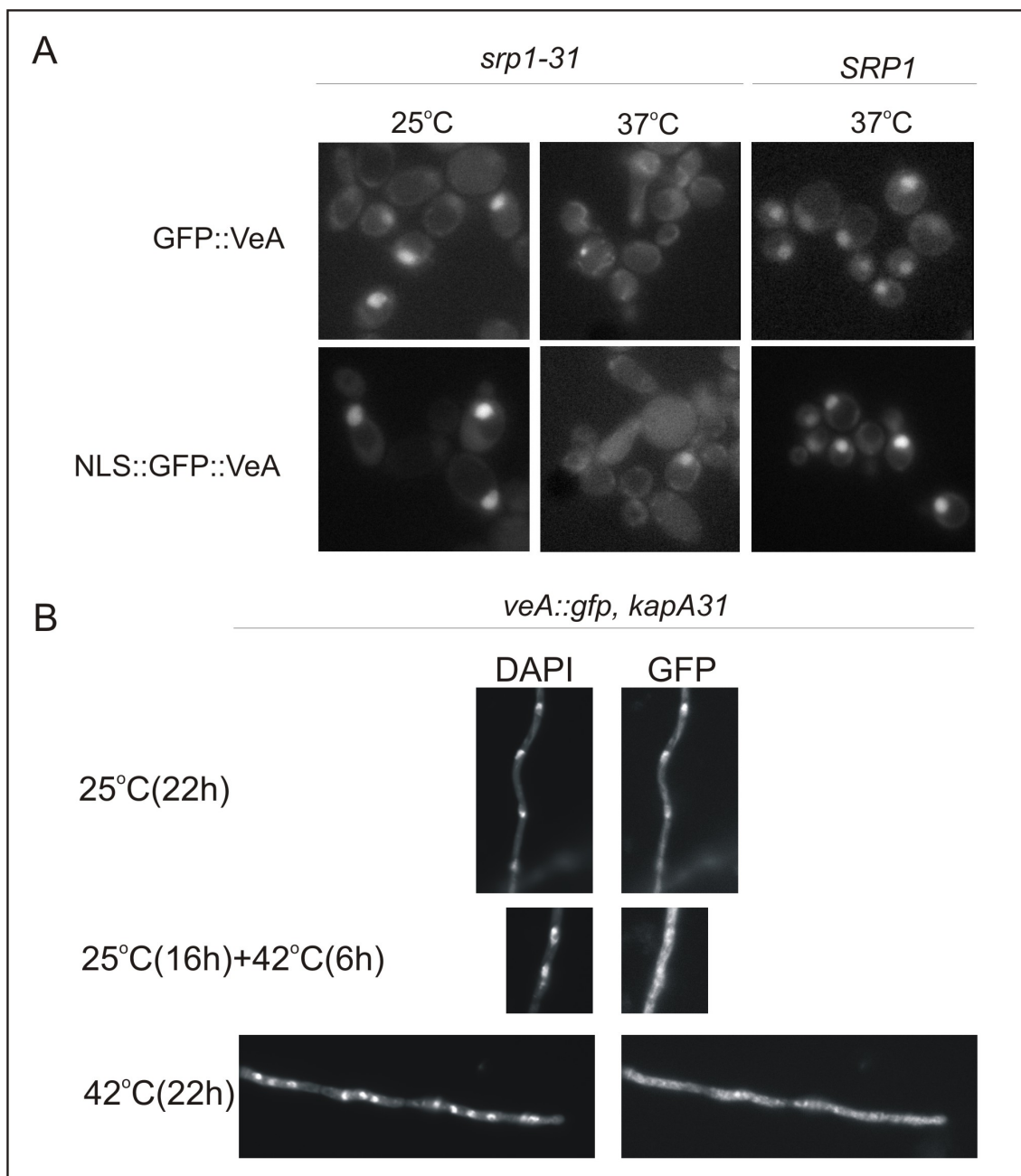


Figura II.29: Localización subcelular de VeA en fondos genéticos mutantes para la Importina α . **A)** Localización subcelular de GFP::VeA en el fondo mutante *srp1-31* a temperatura permisiva (25°C) y restrictiva (37°). Como control se muestra la localización de NLS_{SV40}::GFP::VeA y la localización de ambas proteínas en una cepa silvestre (SRP1). **B)** Efecto de la proteína mutante KapA31 en la localización subcelular de VeA::GFP en *A. nidulans*. A la temperatura restrictiva de 42°C VeA::GFP pierde su localización nuclear (comparar la imagen de la fluorescencia emitida por GFP con la imagen de la fluorescencia emitida por el colorante DAPI).

NLS::GFP a 42°C. Para analizar el efecto de esta importina mutante en la localización subcelular de VeA se generó, mediante cruzamiento génico, una cepa que expresaba VeA::GFP en un fondo genético *kapA31*. Para el análisis con el microscopio de fluorescencia la cepa se creció en condiciones de oscuridad, situación en la cual

VeA::GFP se acumula en el núcleo, como se ha demostrado en el apartado 4.3.2. Como se muestra en la figura II.29B la presencia de la Importina α mutante causó un defecto en la localización nuclear de VeA::GFP cuando las conidiosporas, germinadas a temperatura permisiva, fueron incubadas a 42°C durante 6h. El mismo resultado se obtuvo cuando las conidiosporas fueron germinadas a 42°. Estos resultados demostraban que VeA es transportado por KapA, siendo ésta la primera vez que se describe el efecto de una mutación en la Importina α de un hongo filamentoso sobre una carga natural de este transportador.

El trabajo realizado entorno a VeA ha permitido caracterizar molecularmente la mutación *veA1*. Se ha identificado una NLS bipartita en VeA que es reconocida por la Importina α de *A. nidulans*. En presencia de luz VeA se localiza en el citoplasma permitiendo la expresión de los genes involucrados en la esporulación. En condiciones de oscuridad VeA es transportado al interior del núcleo donde reprimiría los genes de la esporulación. Este transporte es llevado a cabo por KapA y la presencia de una Importina α mutante provoca un defecto en la importación nuclear de VeA. La ausencia de una NLS bipartita funcional en la forma mutante VeA1 hace que ésta no pueda ser transportada al núcleo por lo que tanto en presencia como en ausencia de luz el hongo es capaz de esporular.

El conjunto de los resultados presentados en la Parte II de esta tesis ha llevado a la caracterización de la ruta de importación nuclear mediada por el heterodímero Importina α /Importina β en *A. nidulans*, identificando varias proteínas capaces de interaccionar con la Importina α y demostrando la capacidad de este transportador para reconocer los dos tipos principales de NLSs descritas: NLSs monopartitas (NapB) y bipartitas (VeA).

DISCUSIÓN.

1. El sistema general de importación nuclear en *A. nidulans*.

El heterocomplejo Importina α /Importina β 1 es el transportador de la ruta de importación nuclear. En *S. cerevisiae* existe una única copia de las dos proteínas que forman este complejo; sin embargo, en el caso de *Homo sapiens* se han identificado hasta seis Importinas α diferentes. En este trabajo se ha demostrado que en *A. nidulans* se da la misma situación que en *S. cerevisiae*, encontrándose un único gen que codifica

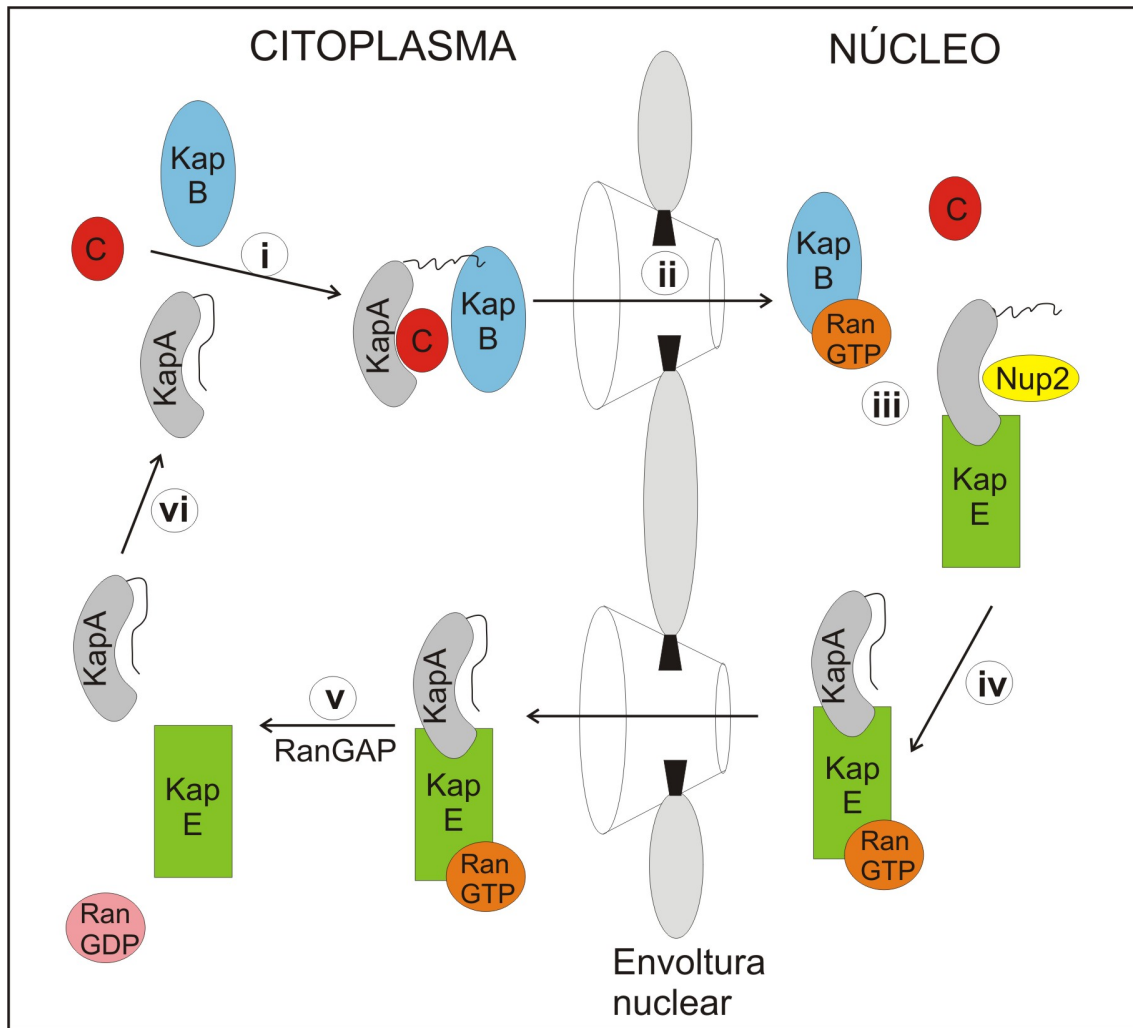


Figura II.30: Modelo propuesto para explicar la ruta de importación nuclear en *A. nidulans*. En el texto se detallan los diferentes pasos y las relaciones que se establecen entre los distintos elementos.

para la Importina α , KapA, y una única Importina β , KapB. En el resto de hongos filamentosos también existe un único homólogo para cada una de las proteínas que forman el heterodímero, con la excepción de *S. pombe* que tiene dos Importinas α . El elevado grado de conservación existente entre las proteínas de *A. nidulans* y las de sus homólogos en otros organismos ha permitido identificar los diferentes dominios funcionales implicados en los procesos de transporte, permitiendo adaptar el modelo de importación nuclear descrito al caso concreto de *A. nidulans*. Dicho modelo queda resumido en la figura II.30. KapA, al igual que sus homólogos en otros organismos, presenta en su región N-terminal un dominio de interacción con la Importina β (IBB) que contiene en su interior los aminoácidos que forman el dominio autoinhibitorio (AID). La interacción del IBB de KapA con KapB dejaría libre el sitio de unión de la carga, permitiendo que se forme el complejo KapA/KapB/Carga (i). La interacción de

KapB con elementos del poro nuclear permitiría el paso del complejo del citoplasma al núcleo (ii). Una vez en el interior, la liberación de la carga estaría promovida por la interacción de KapB con RanGTP así como por la presencia de otros elementos como Nup2 y el exportador de la Importina α , KapE (iii) (ver apartado 3 para más detalle). El reciclaje de KapA al citoplasma lo llevaría a cabo KapE, en asociación con RanGTP, capaz de interaccionar con el Armadillo 10 de KapA (iv). Una vez en el citoplasma, RanGAP promovería la hidrólisis del GTP y KapA quedaría libre para iniciar un nuevo ciclo de importación (v y vi). A pesar del elevado grado de conservación de los diferentes elementos de la ruta, no se puede descartar que existan ciertas diferencias. El análisis de la secuencia de KapA puso de manifiesto la no conservación de un residuo ácido clave para la interacción con CAS, según se ha demostrado para sus homólogos humanos, lo que indica que al menos en este punto deben existir mecanismos particulares en *A. nidulans* que difieren de los descritos en otros organismos.

La importancia de las rutas cuyos factores son transportados al núcleo por el heterodímero Importina α /Importina β se pone de manifiesto con la esencialidad de KapA y KapB. Al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, la ausencia de cualquiera de estas dos proteínas resulta letal para *A. nidulans*. Como ocurría en el caso de KapK, esto hace necesaria la generación de mutantes condicionales que permitan estudiar la ruta en detalle. En este trabajo nos hemos centrado en KapA a la hora de generar mutantes condicionales debido a que es la proteína que interacciona con las cargas y a que al formar parte de un heterodímero su modificación resultará en la alteración indirecta de la función de KapB. En la Importina α de *S. cerevisiae*, Srp1p, se han descrito dos mutaciones condicionales. Por un lado el alelo *srp1-31* da lugar a una Importina α incapaz de reconocer las NLSs de sus cargas⁶⁰. Por otro lado, el alelo *srp1-49* provoca alteraciones en el proceso de degradación de las proteínas¹⁸². Estos dos alelos son capaces de complementarse intragénicamente debido a que las mutaciones que producen se localizan en dos regiones diferentes de Srp1p. La mutación *srp1-31* consiste en un cambio puntual Ser-Phe en el Armadillo 10 y ha sido repetida con éxito en *A. nidulans* en este trabajo. Una cepa de *A. nidulans* portadora del alelo mutante, denominado *kapA31*, muestra serios defectos en la importación de la proteína quimérica NLS::GFP a la temperatura restrictiva de 42°C. Este defecto es aún más acusado cuando la proteína quimérica además de una NLS lleva unida una NES. En este caso es posible observar

núcleos prácticamente vacíos de fluorescencia a 42°C, lo que indica que el único sistema que está funcionando es el de exportación nuclear.

La mutación *srp1-49* no se ha podido repetir en *A. nidulans* porque el aminoácido que es afectado se localiza en una región de la Importina α que no está conservada entre Srp1p y KapA. Esto señala la existencia de dominios funcionales en Srp1p que no están presentes en KapA. Adicionalmente, la mutación *srp1-31* no puede ser complementada con KapA lo que, junto con el dato anterior, sugiere la existencia de diferencias específicas entre los sistemas de los dos organismos modelo.

2. Localización de la maquinaria de importación nuclear.

Una de las formas de empezar a conocer un sistema no estudiado anteriormente es analizar la localización subcelular de los componentes de dicho sistema, pues ello puede ayudar a conocer la función que desempeñan. Así, en *A. nidulans* todas las proteínas que han sido identificadas como posibles elementos del poro nuclear se localizan en pequeños puntos a lo largo de la envoltura nuclear¹⁰⁵. En *S. cerevisiae* los dos componentes del heterodímero Importina α /Importina β comparten la misma localización subcelular y, aunque es posible observar fluorescencia por todo el citoplasma, también presentan una disposición perinuclear¹⁰².

Al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, la Importina α y la Importina β de *A. nidulans* presentan localizaciones subcelulares claramente diferentes. KapB se concentra en la periferia nuclear, mientras que KapA se concentra en el interior del núcleo. La localización subcelular de KapB podría ser debida a su interacción con proteínas del NPC. Existen muchos ejemplos de interacciones entre la Importina β y las proteínas del poro nuclear. Así, en *S. cerevisiae* se ha detectado interacción en experimentos de afinidad entre Kap95p, el homólogo de la Importina β 1, y Nup60p, Nup11p, Nup2p, Nup1p, Nup49p, Nup10p, Nup159, Nsp1p, Nup116p, Nup57p y Nup42p. En los casos de Nup1p, Nup116p y Nup42p la interacción ha sido además detectada en ensayos de doble híbrido. En *A. nidulans* algunas de estas nucleoporinas han sido ya identificadas y analizadas, principalmente en el trabajo desarrollado por el Dr. Stephen Osmani¹⁰⁵. Según el modelo de poro nuclear propuesto para *A. nidulans* el homólogo de Nup2p se localizaría en la cara nuclear del poro, los homólogos de Nup49p, Nsp1p y Nup57p se encontrarían en el canal y los homólogos de Nup159p y Nup42p se localizarían en la cara citoplásmica del poro nuclear. Por tanto, parece

bastante probable que la localización de KapB en la envoltura nuclear se deba a su asociación con diferentes nucleoporinas del NPC. Además, si tenemos en cuenta el modelo propuesto para explicar el paso de los complejos transportadores del núcleo al citoplasma, o viceversa, en el cual se propone que los transportadores atraviesan el canal siguiendo un gradiente de afinidad de interacción con diferentes nucleoporinas, es fácil entender porqué la Importina β interacciona con nucleoporinas situadas tanto en la cara citoplásmica del poro como en la cara nuclear. Adicionalmente, en este trabajo se ha demostrado que la localización subcelular de KapB permanece invariable durante la mitosis, por tanto, debe estar asociada, al menos durante este proceso, a nucleoporinas estructurales que no abandonan el poro en ningún momento del ciclo celular, si bien este tipo de nucleoporinas no han sido identificadas aún como interactores de KapB. Por último, en determinadas ocasiones ha sido posible distinguir una mayor acumulación de KapB en un determinado punto en la periferia nuclear. Este tipo de localización es característica del SPB por lo que también se podría pensar en una asociación entre KapB y este centro organizador de microtúbulos.

Como se ha mencionado anteriormente, KapA se localiza preferentemente en el interior del núcleo. Si la función de la Importina α es transportar proteínas del citoplasma al núcleo, ¿por qué aparece acumulada en el interior de este orgánulo, dónde supuestamente no se la necesita? Es posible que KapA se acumule en el núcleo simplemente porque la velocidad de entrada junto con las cargas sea menor a la velocidad de exportación por parte de KapE/CAS. Los aminoácidos implicados en la interacción Importina α /CAS se sitúan en el dominio IBB y en el Armadillo 10 de la Importina α . Por lo tanto, no se puede descartar que el etiquetado C-terminal de KapA dificulte su interacción con KapE. Otra posible explicación para la acumulación nuclear de KapA es que esta proteína no abandone completamente el núcleo porque en él deba desempeñar alguna otra función. Tanto en eucariotas superiores como en la levadura se ha demostrado que la Importina α desarrolla funciones que nada tienen que ver con la de un mero adaptador de la Importina β 1. En el caso de *Drosophila* y *Xenopus* existe evidencia de la participación de algunas de sus importinas α en procesos de desarrollo y diferenciación ¹⁴⁵. En *S. cerevisiae* se han identificado varios alelos mutantes de *srp1* que causan defectos en los cromosomas y en la segregación nuclear, en la estructura de los husos mitóticos (alelo *srp1-31*) así como defectos en la degradación de proteínas ubiquitinadas (alelo *srp1-49*) ^{154,182,183}. Más recientemente se ha asociado el alelo

mutante *srp1-31* con defectos en la morfología del citoesqueleto de actina y con una disminución de los procesos de endocitosis¹⁸⁴. Como se ha mencionado anteriormente, la mutación del alelo *srp1-49* no ha podido ser extrapolada a *A. nidulans* porque dicha mutación mapea en una región no conservada de KapA, por tanto, no se tienen evidencias de que KapA esté relacionada con procesos degradativos. Por otra parte, la caracterización del alelo *kapA31*, portador de la misma mutación que el alelo *srp1-31*, se ha centrado en los defectos causados a nivel de transporte nuclear, si bien un estudio más detallado del mutante podría revelar la existencia de funciones adicionales de KapA que explicarían la predominante localización nuclear de esta proteína.

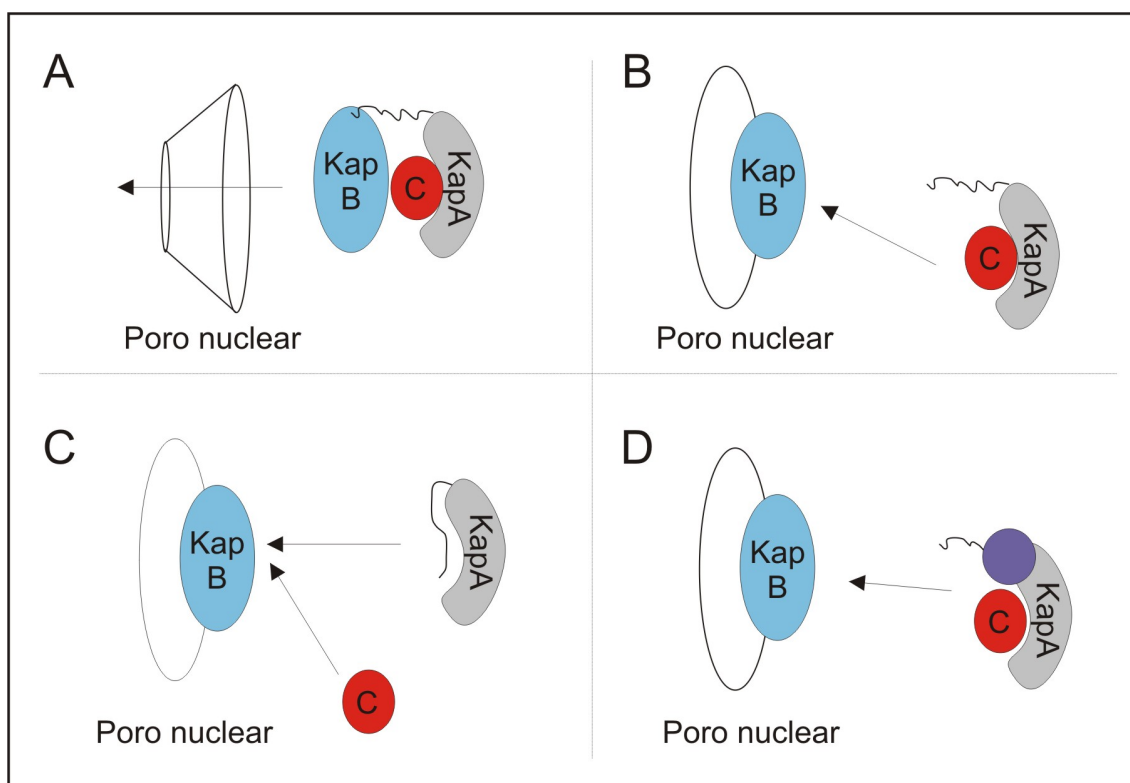


Figura II.31: Modelos propuestos para explicar la formación del complejo importador KapB/KapA/Carga. **A)** Modelo clásicamente propuesto en el que se requiere la interacción previa de la Importina α con la Importina β para que se pueda producir la posterior unión de la carga (C). **B)** Modelo según el cual la carga podría unirse a la Importina KapA en ausencia de KapB, que se localizaría en el poro nuclear. **C)** KapA y la carga se aproximan por separado al poro nuclear y allí se produce la formación del complejo. **D)** La participación de otras proteínas (círculo morado) facilita la interacción de KapA con la carga en ausencia de KapB.

Por último, la diferente localización subcelular de KapA y KapB llevan a plantearse lo siguiente: si se trata de un heterocomplejo, ¿por qué existe esta diferencia? A pesar de que en el modelo clásicamente propuesto para explicar la importación nuclear se requiere la interacción del IBB de la Importina α con la Importina β para

dejar libre el sitio de unión de la carga (Fig. II.31A), se han descrito casos en los que la interacción entre la Importina α y la NLS de la carga es también posible en ausencia de la Importina β , si bien ésta contribuye a aumentar la estabilidad del complejo ¹⁴⁵. Basándonos en esta posibilidad y teniendo en cuenta la preferente localización perinuclear de KapB se pueden proponer tres alternativas para explicar la formación del complejo en las inmediaciones del poro nuclear, donde se localiza KapB. Una opción sería que KapA se aproxime junto con la carga al poro nuclear y allí su interacción con KapB le permita atravesarlo (Fig. II.31B); otra opción sería que KapA y la carga lleguen por separado y una vez en la cara citoplásmica del poro se forme el complejo trimérico (Fig. II.31C); y, por último, puede ocurrir que la interacción de KapA con su carga en ausencia de KapB sea facilitada por otras proteínas (Fig. II.31D). Entre estas proteínas podrían estar las chaperonas Hsp90 y Hsp70 con las que se ha demostrado que es capaz de interaccionar KapA (ver apartado 4.1 de resultados).

3. Cargas reconocidas por la Importina α de *A. nidulans*.

La organización en repeticiones Armadillo de la Importina α genera una estructura helicoidal por cuya cara interna se produce la interacción con las NLS. Los Armadillos (ARM) implicados en esta interacción son los ARM 2 a 4, que constituyen el sitio de mayor afinidad, y los ARM 7 y 8 que forman el sitio de menor afinidad de unión. Los residuos clave para que se produzca la interacción con la carga son dos residuos situados en la hélice 3 de estos armadillos, un residuo de triptófano y otro de asparagina situados en la tercera y cuarta vuelta de la hélice, respectivamente ¹⁴⁸. Estos residuos también están conservados en KapA lo que hace suponer que los mecanismos de interacción con la carga deben ser similares a los descritos en otros organismos. De igual forma, la implicación de RanGTP en la liberación de la carga una vez atravesado el poro nuclear también parece estar conservado pues KapB presenta en su secuencia de aminoácidos el dominio de interacción con Ran. Además de RanGTP, existen otros factores que contribuyen a desensamblar el complejo Importina/Carga. Estos factores son el exportador de la Importina α , CAS/Cse1p y la nucleoporina Nup2p. Como se ha comentado anteriormente, ambos factores están conservados en *A. nidulans*. La unión de CAS/KapE estimularía la liberación de la carga para prevenir que ésta saliera de nuevo al citoplasma junto con la Importina α . Además, en *S. cerevisiae* se ha demostrado que CAS se une preferentemente a la Importina α cuando no existe carga

unida lo que contribuiría al reciclaje de las proteínas que ya han cumplido su función como importadores ^{185,186}. En el caso de Nup2p, su homólogo en *A. nidulans* ha sido caracterizado por el grupo del Dr. Stephen Osmani, poniéndose de manifiesto un elevado nivel de similitud entre ambas proteínas ¹⁰⁵. Tanto Nup2p como su homólogo en *A. nidulans* presentan en su región N-terminal un dominio de interacción con la Importina α . En *S. cerevisiae* este dominio es capaz de interaccionar con el sitio de unión de NLSs por lo que compite con la carga por su interacción con la Importina α . Por último, otro elemento que puede contribuir a la liberación de la carga es el DNA. Existen varios ejemplos de proteínas donde la NLS solapa con el dominio de unión a DNA. Este es el caso de los factores de transcripción de *A. nidulans* PrnA ¹³⁸, AlcR ¹⁸⁷ y la NLS1 de PacC ⁶⁶, o el caso de Gal4p de *S. cerevisiae* ¹⁸⁸. El solapamiento de ambos dominios funcionales hace que la unión a DNA y la interacción con la Importina α sean mutuamente excluyentes, constituyendo un mecanismo de control adicional en la disociación de la carga.

La Importina α de *A. nidulans*, como se ha demostrado en este y otros trabajos previos, reconoce NLSs clásicas. Una de las NLS clásicas por excelencia es la NLS del antígeno T grande del virus SV40. Los experimentos realizados en *S. cerevisiae* con proteínas quiméricas demuestran que esta señal funciona como una NLS, acumulándose la proteína en el interior del núcleo ¹⁸⁹. En *A. nidulans* esta señal también es reconocida por KapA, sin embargo, la importación nuclear de las proteínas quiméricas generadas no es tan eficiente como la observada en *S. cerevisiae*. Este hecho refleja de nuevo la existencia de diferencias entre los sistemas de ambos organismos.

La primera carga de KapA identificada fue el factor de transcripción PacC ⁶⁶. En este FT existen dos NLS: la NLS1, que solapa con el dominio de unión a DNA y es reconocida por el transportador KapM/Exportina-t, y la NLS2, reconocida por KapA. La NLS2 es una NLS bipartita y tan solo está presente en dos formas fisiológicas de PacC: PacC^{53kDa} y PacC^{72kDa}. Mientras que la NLS1 es constitutiva, la accesibilidad de KapA a la NLS2 depende de la activación de la ruta *pal* en respuesta al pH ambiental. Otro ejemplo de NLS bipartita regulada parece ser la NLS encontrada en VeA. En esta proteína aparece un dominio pat7, que se ajusta al consenso establecido para NLS monopartitas. Sin embargo, el trabajo llevado a cabo con VeA ha demostrado que esta posible NLS no es funcional y la proteína requiere la señal bipartita identificada para interaccionar con KapA y ser importada al núcleo. Los resultados de doble híbrido e

interacción *in vitro* entre KapA y VeA sugieren la posibilidad de que se produzca una modificación post-transcripcional de VeA *in vivo* que module la interacción con KapA. Este tipo de modificación podría ser la responsable de la activación de la NLS en respuesta a la luz, pues, como se ha demostrado, la localización nuclear de VeA::GFP es dependiente de la ausencia de luz. De acuerdo con esto, se han descrito casos en los que la unión de la NLS a la Importina α está regulada por mecanismos de fosforilación de forma que la fosforilación de residuos adyacentes a la NLS aumenta la importación nuclear de la proteína en cuestión ¹⁹⁰. En la secuencia de aminoácidos de VeA se han encontrado varios sitios de fosforilación que están siendo actualmente analizados para comprobar si realmente existe fosforilación de VeA en *A. nidulans* que pueda contribuir a aumentar su afinidad por KapA.

En lo que se refiere a NLSs monopartitas se ha identificado una *nucleosome assembly protein*, NapB, que contiene en su secuencia una NLS monopartita que es reconocida por KapA. La ausencia de esta NLS impide la interacción con KapA pero no la localización nuclear de NapB. Adicionalmente, esta localización nuclear tampoco se ve afectada por la presencia de la proteína mutante KapA31, lo que sugiere la existencia de mecanismos adicionales en la importación al núcleo de NapB. Una posibilidad es que NapB entre al núcleo asociado a las histonas, por lo que no sería necesaria una interacción directa con el transportador. Otro factor a tener en cuenta en el estudio de la localización subcelular de NapB es su capacidad para quedar retenida en el núcleo aún en ausencia de mecanismos de transporte activo. Trabajo previo desarrollado en el laboratorio ya puso de manifiesto la capacidad del FT PacC para quedar retenido en el núcleo gracias a su interacción con el DNA ⁶⁶. En el caso de NapB, dada su supuesta capacidad para ensamblar nucleosomas, la retención en el núcleo puede ser debida a su asociación con la cromatina. Sin embargo, existe una diferencia importante entre PacC y NapB. Mientras que el primero permanece en el interior del núcleo durante la mitosis, NapB sale al citoplasma y recupera su localización nuclear una vez concluida la división nuclear. Esto indica que durante la mitosis NapB debe perder la capacidad de interacción con aquellos elementos nucleares que lo retienen en su interior durante la interfase.

La búsqueda de proteínas capaces de interaccionar con KapA se abordó utilizando una versión truncada de la Importina α , KapA⁵⁰, que carece del dominio IBB. De esta manera se evitaba la presencia del dominio autoinhibitorio que podía impedir la interacción de las cargas con KapA. A parte de NapB, en esta búsqueda se han

encontrado varias proteínas capaces de interaccionar con KapA pero en las que no se ha identificado una secuencia que pueda actuar como NLS, tal es el caso de la ciclina NimE o la helicasa nKuA. La interacción de estas proteínas con KapA podría estar mediada por la presencia de otras proteínas como las chaperonas Hsp70 y Hsp90 que también han sido identificadas en los ensayos de afinidad. Por último, una de las proteínas identificadas ha sido NudK, una subunidad de la dinactina. En esta proteína tampoco existe una secuencia que pueda actuar como NLS, sin embargo, su identificación reforzaba la relación encontrada entre el citoesqueleto y los procesos de transporte nuclear.

4. Los citoesqueletos de actina y tubulina parecen desempeñar un importante papel en los procesos de transporte nuclear.

Al hablar de transporte nuclear se tiende a pensar en un proceso que se produce en las inmediaciones del núcleo. En una célula pequeña y uninucleada como la levadura *S. cerevisiae* la transmisión de las señales del citoplasma al núcleo no parece muy complicada. Sin embargo, en un organismo multinucleado como *A. nidulans*, donde la distancia entre los distintos núcleos es considerable, deben existir sistemas reguladores que controlen la distribución de proteínas o factores de transcripción entre los diferentes núcleos. Como se ha demostrado en esta tesis la punta de la hifa es una zona de gran actividad endocítica y exocítica a donde deben llegar y de donde parten diferentes proteínas. Algunas de estas proteínas son FT que deben llegar al núcleo para activar o reprimir genes en respuesta a una determinada señal. Un ejemplo de ello es el FT FlbB que se localiza preferentemente en la punta de la hifa y en los núcleos más próximos al ápice¹⁹¹. Cómo llegan las proteínas hasta el núcleo es un hecho aún desconocido. Un sistema bastante parecido a *A. nidulans* es el que aparece en los axones de las neuronas donde la señal debe ser transmitida hasta la dendrita. En este caso se ha demostrado que las proteínas portadoras de NLSs que deben transmitir la señal a la dendrita viajan hasta ella asociadas al complejo Importina α /Importina β gracias a la capacidad de la Importina α de interaccionar con la dineína y al movimiento de ésta por los microtúbulos¹⁵⁸. La importancia del citoesqueleto en el tráfico núcleo-citoplásmico ha sido puesta de manifiesto en otros trabajos si bien se desconocen las bases moleculares, como ocurre con la asociación microtúbulos-Importina α observada en plantas¹⁵⁹. Adicionalmente, se ha demostrado que los microtúbulos se requieren para que varias proteínas se

aproximen al núcleo como en el caso de la proteína p53 de humanos o de la hormona paratiroidea^{192,193}. Además del citoesqueleto de microtúbulos, también existen evidencias de la conexión entre la maquinaria de transporte y los microfilamentos de actina como en la interacción observada entre la Importina α y el complejo ARP2/3 en levadura¹⁹⁴, y en su relación con el proceso de endocitosis en metazoos mediante su asociación con membranas y el transporte de moléculas señalizadas de la membrana citoplásmica al núcleo^{159,195}.

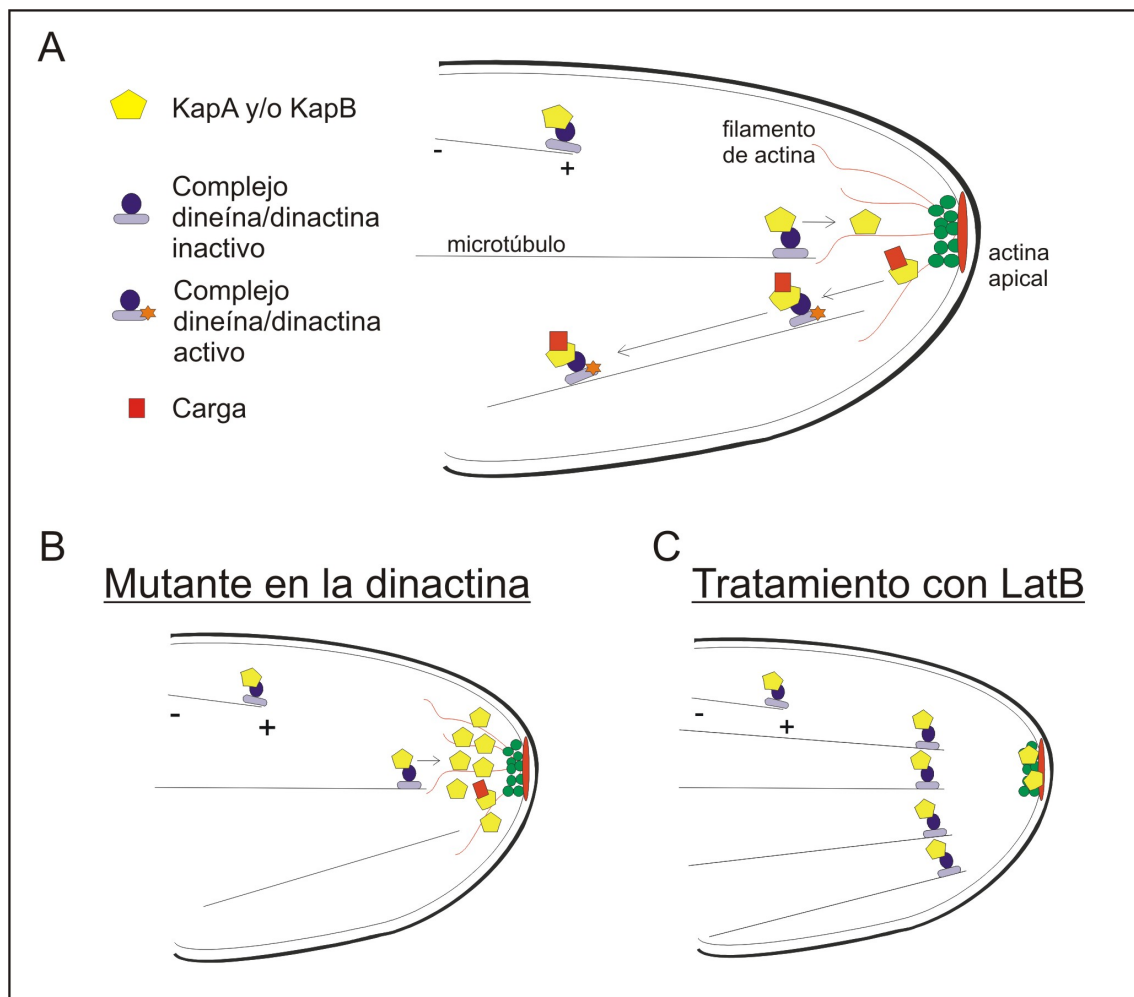


Figura II.32: Modelo propuesto para explicar cómo se produce el desplazamiento de KapA y KapB por el citoplasma de la hifa. A) El desplazamiento de KapA y KapB hasta la punta de la hifa requiere de la existencia de microtúbulos y filamentos de actina, así como del complejo dineína/dinactina (ver texto para más detalle). **B)** Una mutación en la dinactina provoca la acumulación apical de KapA. **C)** La destrucción de los filamentos de actina provoca la acumulación subapical de KapA.

El análisis de la localización subcelular de KapA y KapB parece indicar que los citoesqueletos también van a desempeñar un importante papel en el transporte de proteínas hacia el núcleo. En función de los resultados obtenidos se podría proponer un

modelo de desplazamiento de KapA y KapB por el citoplasma que queda resumido en la figura II.32. Aunque no ha sido posible determinar si ambas proteínas viajan juntas o por separado, en ambos casos el desplazamiento depende de la existencia de microtúbulos, como ha quedado demostrado con la utilización de benomilo, un complejo desestabilizador de microtúbulos. Según el modelo propuesto, el desplazamiento hasta la punta de la hifa se produciría aprovechando el crecimiento de los microtúbulos y el movimiento retrógrado estaría mediado por la actividad del complejo dineína/dinactina (Fig. II.32A). Por tanto, una alteración en este complejo provocaría la acumulación de la Importina α y/o β en la región apical de la hifa (Fig. II.32B). Por su parte, el citoesqueleto de actina sería necesario para facilitar la llegada del transportador al ápice de la hifa donde no llegan los microtúbulos y existe una elevada concentración de vesículas (Fig. II.32A). La destrucción de estos filamentos de actina impediría que la Importina alcance el ápice de la hifa, quedando acumulada en la región subapical (Fig. II.32C).

Los resultados obtenidos son muy interesantes si bien necesitan ser avalados con trabajos futuros que permitan determinar si el movimiento observado en KapA y KapB se debe a su desplazamiento en busca de la carga, si ambas proteínas viajan formando un heterodímero o cada una por separado, los mecanismos implicados en la interacción con los citoesqueletos y, por último, su papel en las rutas de transmisión de la señal.

5. Nucleosome assembly proteins en *A. nidulans*.

En este trabajo se ha demostrado que en *A. nidulans* existen dos miembros de la familia de chaperonas de histonas tipo Nap/SET, NapA y NapB. NapA es el homólogo de Nap1p y estaría más relacionada con las proteínas tipo Nap. Por el contrario, NapB es el homólogo de Vps75p y estaría más relacionada con las proteínas SET de metazoos. La capacidad de Nap1p de *S. cerevisiae* de interaccionar con histonas y su papel en la remodelación de la cromatina se conocen desde hace tiempo ¹⁹⁶; sin embargo, la actividad ensambladora de nucleosomas y la capacidad de Vps75p de interaccionar con el complejo H3/H4 ha sido demostrada recientemente ¹⁶⁷. Las proteínas SET de metazoos también están implicadas en los procesos de remodelación de la cromatina. Así, la proteína SET de humanos recluta al complejo ciclina B-CDK1 para promover la modificación de la histona H1 ¹⁹⁷. El papel de las proteínas SET como chaperonas de histonas y factores implicados en la remodelación de la cromatina ha sido descrito en la proteína PfNapS de *Plasmodium*, capaz de interaccionar con el complejo

H3/H4 y con la histona H1 a través de su extremo C-terminal ¹⁹⁸. Estas proteínas también parecen estar implicadas en el control del ciclo celular. Así, la proteína SET de humanos previene la progresión del ciclo celular en la transición G2/M inhibiendo la actividad del complejo ciclina B-CDK1 mediante su interacción directa con la ciclina B y con el inhibidor de la CDK p21^{Cip1} ¹⁹⁷.

En lo que a localización subcelular se refiere existen importantes diferencias entre NapA y NapB. Como se ha mencionado anteriormente, NapB se localiza en el interior del núcleo durante la interfase. Aunque se ha demostrado que su NLS es reconocida por la Importina α de *A. nidulans*, parecen existir mecanismos adicionales que contribuyen a su localización nuclear. Por un lado, su asociación con las histonas podría contribuir a su transporte nuclear y su relación con la cromatina explicaría la retención nuclear de NapB en ausencia de procesos de transporte. NapA, al igual que su homólogo Nap1p, tiene en su secuencia una NLS y una NES. La NLS es muy diferente a la encontrada en NapB, Vps75 y otras proteínas SET y no es reconocida por la Importina α . En Nap1p esta NLS es reconocida por Kap114p, sin embargo, no parece ocurrir lo mismo en *A. nidulans*, pues no se ha observado interacción entre NapA y KapG, el homólogo de Kap114p. Por tanto, los sistemas de importación de este tipo de proteínas en *A. nidulans* parecen diferir de los descritos en *S. cerevisiae*. Aunque no se ha podido determinar un sistema de importación nuclear de NapA que demuestre la funcionalidad de la NLS, la NES sí parece ser funcional. Los resultados obtenidos por Laura Mellado, actual miembro del laboratorio, han revelado que NapA presenta una localización citoplásmica, lo que sería indicativo de un proceso de exclusión nuclear activo.

Los miembros de la familia Nap/SET han sido previamente descritos como proteínas capaces de interaccionar con ciclinas tipo B ^{168,174}, sin embargo, ninguna de las proteínas tipo Nap/SET identificadas en *A. nidulans*, NapA y NapB, son capaces de interaccionar con NimE, el ortólogo de Clb2p y la única ciclina tipo B caracterizada en *A. nidulans* ¹⁷⁵. La localización nuclear de NimE depende de NimA, una quinasa necesaria para la entrada en mitosis, y de SonA, el ortólogo de Gle2p/Rae1p ¹⁹⁹, si bien el mecanismo de importación nuclear no ha sido aún caracterizado. En *S. cerevisiae*, tanto Clb2p como Gle2p/Rae1p son capaces de interaccionar con la Importina α (Srp1p) ^{200,201}. Dada la competición existente entre NapB y NimE por la unión con KapA se podría proponer una hipótesis en la cual la localización nuclear de NimE dependería del

balance existente entre la ruta de entrada mediada por KapA y su salida del núcleo vía SonA. En este equilibrio NapB tendría un papel negativo puesto que su unión a KapA impediría la unión, y por tanto, la importación de NimE al núcleo quedando sólo activa la ruta de salida a través de SonA. De esta forma la Importina α estaría implicada no sólo en procesos de transporte nuclear sino también en la progresión del ciclo celular.

6. La respuesta a la luz en *A. nidulans*.

El desarrollo sexual y el control del metabolismo secundario son dos procesos genéticamente ligados en *A. nidulans* que están controlados por la respuesta del hongo a la luz¹⁷⁸. En presencia de luz *A. nidulans* se desarrolla asexualmente mientras que en oscuridad se produce un desarrollo sexual que lleva asociado un aumento en la producción de metabolitos secundarios como la esterigmatocistina²⁰². En el control de estos procesos la localización subcelular de VeA y, por tanto, su importación por parte de la Importina α , desempeña un papel fundamental.

El estudio de la localización subcelular de VeA ha demostrado que dicha localización es dependiente de la luz. En presencia de luz la proteína se localiza en el citoplasma mientras que en condiciones de oscuridad su localización es preferentemente nuclear. Como se ha mencionado anteriormente, la ausencia de luz promueve el desarrollo sexual del hongo, por tanto, para que se produzca este tipo de desarrollo es necesario que VeA se localice en el núcleo. La localización nuclear de VeA depende de su interacción con la Importina α y en esta interacción está implicada la NLS bipartita de VeA. La identificación de esta NLS y el análisis de la localización subcelular de la proteína han permitido comprender biológica y molecularmente el fenotipo de una mutación presente en la mayoría de las cepas de *A. nidulans* utilizadas en los laboratorios, la mutación *veA1*. El alelo *veA1* da lugar a una forma truncada de la proteína que carece de la mayor parte de la NLS bipartita. Este truncamiento es suficiente para impedir la localización nuclear de VeA1 y, en consecuencia, para permitir la esporulación de las cepas que son cultivadas en oscuridad.

Recientemente, se ha establecido un modelo para explicar molecularmente el papel de VeA en el desarrollo sexual y en la producción de metabolitos secundarios¹⁷⁸. Este modelo queda resumido en la figura II.33. Los genes que codifican para metabolitos secundarios aparecen en “clusters” en el genoma de *A. nidulans* y su expresión está regulada por la proteína LaeA^{203,204}. Bayram *et al.* han demostrado que

VeA es capaz de interactuar con LaeA y con VelB (*velvet like protein B*)¹⁷⁸. Este complejo se forma en el interior del núcleo y depende de la ausencia de luz, situación en la cual VeA es importado al núcleo por KapA. Además, VelB carece de NLS por lo que su entrada al núcleo parece depender de su asociación con VeA en el citoplasma. Una vez en el núcleo, el complejo VeA/VelB/LaeA promovería la expresión de los genes del metabolismo secundario y, por separado o formando un complejo con alguna otra proteína, VeA/VelB promovería el desarrollo sexual del hongo. En el mecanismo de respuesta a la luz existen tres posibles factores que interactuarían con VeA en el citoplasma, quizás impidiendo su reconocimiento por parte de KapA. Estos factores son: el fitocromo FphA, los receptores de luz azul LreA y LreB, y el criptocromo CryA²⁰⁵⁻²⁰⁷. A pesar de que también se ha demostrado que VeA y FphA interactúan en el núcleo, falta por encontrar una relación directa entre los receptores de luz y la proteína LaeA que controla la expresión de los metabolitos secundarios. La ausencia de VeA en el núcleo promueve el desarrollo asexual del hongo a la vez que se produce una disminución en la producción de metabolitos secundarios.

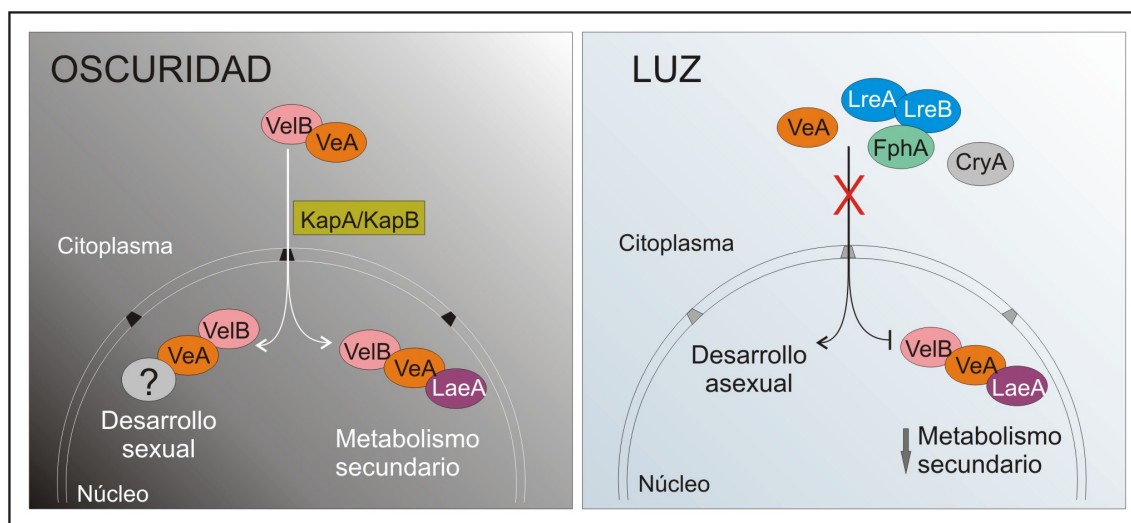


Figura II.33: Luz y oscuridad en *A. nidulans*. El desarrollo sexual y la producción de metabolitos secundarios en *A. nidulans* están controlados por la respuesta del hongo a la luz. La presencia de VeA en el interior del núcleo desempeña un papel esencial en el control de la expresión génica de los genes implicados en estos procesos (ver texto para más detalle).

En resumen, la localización subcelular de VeA, dependiente de su interacción con la Importina α a través de la NLS bipartita identificada, constituye un punto de control crucial para el desarrollo sexual y la producción de metabolitos secundarios del hongo, siendo posible bloquear ambos impidiendo el transporte al núcleo de VeA. La

mayor caracterización de estos procesos puede traducirse en un modo de controlar la producción de micotoxinas o de aumentar la producción de penicilina.

Caracterización del mutante termosensible *pprA1*

APÉNDICE 1

INTRODUCCIÓN.

El número de proteínas mitocondriales en plantas oscila entre 2000 y 3000 ²⁰⁸, sin embargo, el genoma mitocondrial sólo codifica para una fracción reducida de estas proteínas, el resto son codificadas por genes nucleares ²⁰⁹. Un gran número de estas proteínas están implicadas en procesos pre y post-transcripcionales en la mitocondria, aunque se sabe muy poco de ellas, entre ellas se han identificado varias proteínas con repeticiones pentatricopéptidicas (PPR). La familia de proteínas PPR es específica de eucariotas y especialmente abundante en plantas, si bien se han identificado proteínas PPR en otros organismos. Así, pertenecen a esta familia la proteína CRP1 de maíz ²¹⁰, Pet309p de *S. cerevisiae* ²¹¹, Cya-5 de *Neurospora crassa* ²¹² y LRP130 (LRPPRC) de humanos ²¹³.

El motivo PPR está formado por 35 aminoácidos cuya secuencia se ajusta al patrón de la entrada PF01535 de la base de datos de Pfam. Este motivo pentatricopeptídico se suele repetir entre 2 y 26 veces en una misma proteína ²¹⁴. Según el modelo tridimensional propuesto, una repetición PPR estaría formada por dos hélices α y el conjunto de las repeticiones formaría una súper-hélice similar a la generada por las repeticiones HEAT o Armadillo ²¹⁵. De acuerdo con su previsible función mitocondrial, o en cloroplastos, casi la mitad de las proteínas PPR identificadas en plantas contienen secuencias que podrían actuar como señales de localización mitocondrial, de hecho el trabajo realizado por Lurin et al. ²¹⁴ ha demostrado que la mayoría de estas proteínas se localizan en mitocondrias o cloroplastos y tan solo en el caso de la proteína GRP23 (“Glutamina rich-protein 23”) se ha observado una localización nuclear ²¹⁶.

El modelo de estructura terciaria propuesto para el motivo PPR permitió establecer la hipótesis de que estos motivos podrían unir moléculas de RNA ²¹⁵, lo cuál ha sido demostrado posteriormente estudiando varios miembros de la familia de proteínas PPR ^{214,217-221}. La relación directa entre las proteínas PPR y la expresión de los genes mitocondriales es un hecho, aunque éstas actúan a diferentes niveles, así: i) se han encontrado proteínas PPR asociadas con la RNA polimerasa mitocondrial ²²²; ii) intervienen en procesos de “splicing” y “editing” ^{223,224}; iii) juegan un papel importante en la iniciación de la traducción ^{211,212}; y iv) pueden estar asociadas a ribosomas donde podrían promover el desplazamiento de la maquinaria de traducción hacia la membrana interna mitocondrial para facilitar la inserción de los nuevos péptidos sintetizados en el complejo del que vayan a formar parte ²²⁵ (tomado de la referencia ²²⁶).

En este apéndice se presenta el trabajo realizado para la descripción de la primera proteína con repeticiones PPR identificada en *A. nidulans*. El estudio realizado ha llevado a la caracterización funcional del gen *pprA* mediante técnicas de genética en reverso, generando un alelo nulo, y el aislamiento y análisis fenotípico de una mutación condicional. La proteína PprA es, al igual que muchas de las identificadas en plantas, esencial para el hongo y participa en diferentes procesos vitales para la célula del hongo filamentoso: la distribución de los núcleos en el citoplasma, la organización del citoesqueleto de actina y en la morfología de las mitocondrias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. Aislamiento y caracterización del mutante *pprA1*.

Utilizando luz UV como mutágeno para el aislamiento de mutantes condicionales afectados en el transporte nuclear del factor transcripcional PacC se seleccionó una cepa portadora de una mutación termosensible, siendo 42°C la temperatura restrictiva para el crecimiento colonial (Fig. A1.1A). El análisis al microscopio de fluorescencia de las conidiosporas germinadas a 42°C mostró que los núcleos, teñidos con el marcador fluorescente GFP::PacC(5-250), presentaban una distribución defectuosa a lo largo del citoplasma de las germínulas sugiriendo que podría tratarse de un gen *nud*, involucrado en la distribución nuclear. La localización de la mutación en el cromosoma III mediante técnicas genéticas mostró que el gen afectado no podría ser uno de los genes *nud* previamente identificado, dado que ninguno reside en dicho cromosoma. Este hecho, junto con el mantenimiento de un transporte nuclear activo del marcador PacC a largos tiempos de incubación a la temperatura restrictiva hizo interesante el posterior estudio de esta cepa mutante.

El carácter termosensible y recesivo de la mutación permitió la identificación del gen mutado mediante complementación con una genoteca de DNA genómico construida en el plásmido autorreplicativo pRG3-AMA1^{227,228}. Se obtuvieron transformantes con capacidad de crecer a 42°C de los cuales se obtuvo DNA plasmídico transformando el DNA genómico en la cepa DH1 de *E. coli*. La secuenciación del inserto de DNA genómico procedente del plásmido recuperado de los transformantes termoresistentes llevó a la identificación del locus *AN4433*, utilizando la base de datos del genoma de *A. nidulans*. El locus *AN4433* está en el Contig 77, que pertenece al cromosoma III, lo que garantizaba la correcta identificación del gen portador de la mutación, sin embargo para su confirmación se compararon las secuencias de la región codificante del gen *AN4433*

procedente de la cepa silvestre y la mutante, encontrando una transición G-A que convertía el codón AAT (392), que codifica para un residuo de asparagina, en un codón GAT, que codifica para un ácido aspártico (Fig. A1.1B). La proteína hipotética codificada por el gen *AN4433* contiene en su estructura primaria varias repeticiones pentatricopeptídicas (PPR) por lo que se decidió denominar *pprA* al gen *AN4433*. El alelo mutante termosensible ha sido designado como *pprA1*.

El elevado número de proteínas con repeticiones PPR que existen en plantas así como la importancia de los procesos en las que parecen estar implicadas, junto con el fenotipo tipo “*nud*” observado a 42°C en el alelo *pprA1*, sustentaban el seguir estudiando este gen a pesar de no estar implicado en los procesos de transporte nuclear, propósito para el cual fue inicialmente aislado.

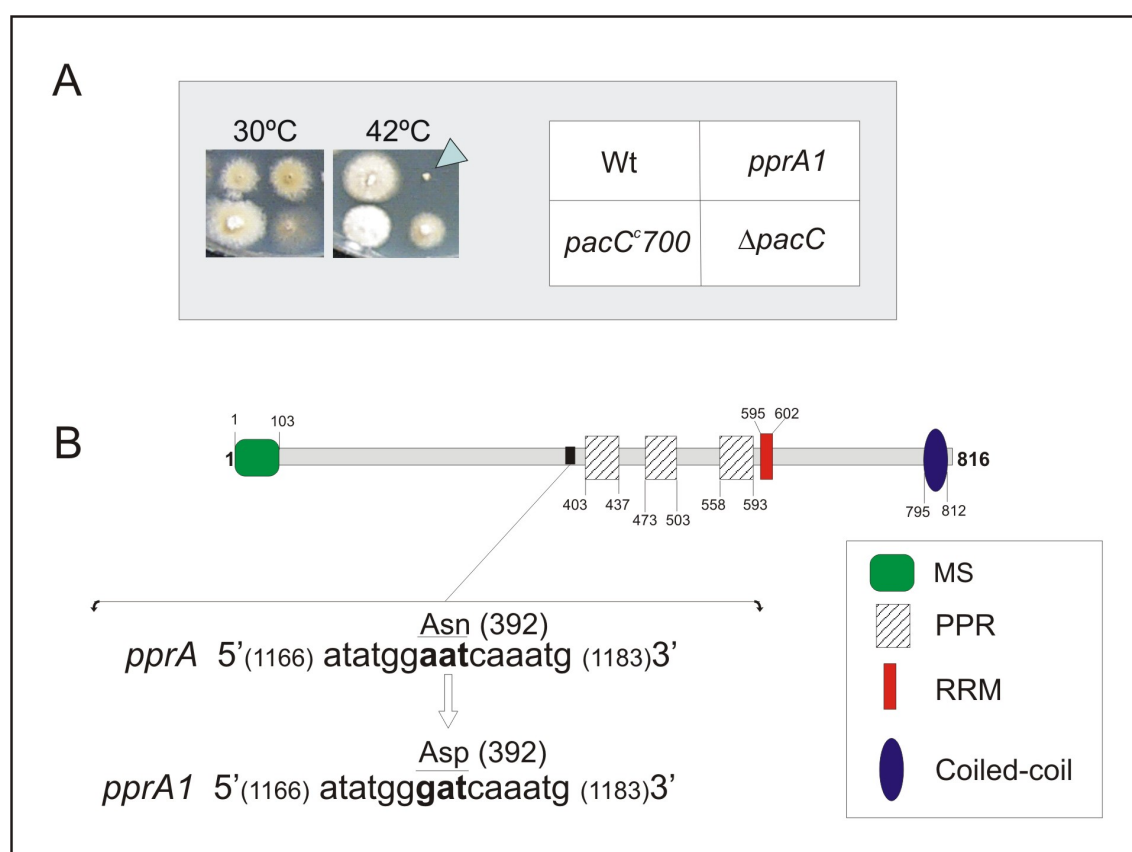


Figura A1.1: Caracterización del alelo mutante *pprA1*. **A)** Fenotipo de termosensibilidad causado por la mutación. La punta de flecha señala la cepa portadora de la mutación. **B)** Representación esquemática de los dominios funcionales presentes en PprA. Se indica también la posición de la mutación así como el cambio de aminoácido al que da lugar. MS: señal mitocondrial; PPR: repetición pentatricopeptídica; RRM: “RNA recognition motif”.

2. Caracterización del gen *pprA*.

El gen *pprA* está situado en el brazo izquierdo del cromosoma III, ligado al locus *argB* lo que permitió su rápida localización cromosómica. La caracterización de las versiones genómica y cDNA reveló que la región codificante, que comprende 2.451 pares de bases, no contiene ningún intrón y su traducción conceptual daría lugar a una proteína, PprA, de 816 aminoácidos con un peso molecular estimado de 92kDa, aproximadamente.

Se han utilizado diferentes programas (servidores) disponibles en la red para determinar la presencia de posibles dominios funcionales en PprA. El servidor Web <http://expasy.org/prosite/> detectó tres posibles repeticiones PPR, situadas entre los residuos 403-437, 473-503 y 558-593 (Fig. A1.1B). En plantas, un número elevado de proteínas mitocondriales y de cloroplastos contienen este tipo de repeticiones, por este motivo, se decidió analizar la secuencia de la proteína en busca de señales de localización mitocondrial, utilizando para ello el servidor Web <http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html> el cual pronosticó la presencia de una señal mitocondrial en el extremo N-terminal de PprA, entre los residuos 1 a 103. De acuerdo con un posible papel transcripcional de las proteínas con dominios PPR, PprA contiene entre los residuos 595 y 602 la secuencia: -RGMYYLLL-; la cuál se ajusta al consenso establecido para las secuencias con capacidad de unir RNAs (RRM, por RNA Recognition Motif; Patrón Prosite [RK]-G-{EDRKHPCG}-[AGSCI]-[FY]-[LIVA]-x-[FYLM]). La búsqueda de otros dominios realizada a través del servidor http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html predijo un putativo dominio “coiled-coil”, en el extremo C-terminal de PprA (residuos 795-812) que podría estar implicado en interacciones proteína-proteína, (Fig. A1.1B).

En el genoma de *A. nidulans* se han encontrado otros cinco genes que codifican para proteínas con repeticiones PPR, si bien ninguno de ellos ha sido caracterizado. Sin embargo, la búsqueda de posibles homólogos de la proteína PprA en otros organismos modelo ha mostrado que el gen *pprA* es exclusivo de hongos filamentosos. Hasta la identificación de PprA, la única proteína con repeticiones PPR que ha sido caracterizada en hongos filamentosos es Cya-5 de *Neurospora crassa*, que a semejanza de algunas proteínas PPR de plantas, se trata de una proteína mitocondrial necesaria para que se produzca la correcta traducción del mRNA de *coxI* que codifica para la subunidad 1 de la citocromo *c* oxidasa ²¹².

3. *pprA* es un gen esencial.

Para caracterizar funcionalmente el gen *pprA* se generó su alelo nulo mediante reemplazamiento génico, sustituyendo la región codificante del *locus pprA* por el gen *pyrG* de *A. fumigatus*. Se construyó, mediante PCR de fusión, un casete de reemplazamiento consistente en el gen *pyrG* de *A. fumigatus* flanqueado por las regiones que contienen el promotor y el terminador de *pprA*. Este fragmento de DNA se transformó en la cepa MAD1425 auxótrofa para pirimidinas. Los transformantes obtenidos en el medio de regeneración, seleccionados por prototrofia a pirimidinas, presentaron un claro aspecto heterocariótico, colonias de aspecto arborescente y con escasa esporulación. La formación de estos heterocariontes indicaba que muy probablemente el fenotipo del alelo nulo de *pprA* era letal. Para confirmar este resultado se sembraron conidiosporas procedentes de las colonias heterocarióticas en placas +UU y -UU. Estas conidiosporas, que son uninucleadas, geminaron normalmente en la placa conteniendo MMA+UU pero fueron incapaces de crecer sobre MMA-UU (Fig. A1.2A). La heterocariosis fue confirmada mediante PCR amplificando el locus *AN4433*, utilizando como molde el DNA genómico de los transformantes, con los oligonucleótidos NpprA1, G7N y G7G. La pareja de oligonucleótidos NpprA1 y G7N amplificaría una región de 4,2kb usando como molde el DNA de un núcleo silvestre y una región de 3,6kb con DNA de un núcleo *ΔpprA*; la pareja de oligonucleótidos G7G y G7N ha de amplificar una región de 1,7kb a partir de DNA genómico procedente de núcleos silvestres y no habría producto amplificado a partir del DNA de núcleos *ΔpprA* ya que el oligonucleótido G7G anilla con su secuencia complementaria dentro de la región codificante de *pprA*. Congruentemente, el resultado de estas PCRs mostró dos fragmentos amplificados en la cepa silvestre de 1,7kb y 4,2kb y tres bandas de 1,7kb, 3,6kb y 4,2kb en los heterocariontes (Fig. A1.2B), siendo la banda intermedia diagnóstico de la existencia de un heterocarionte. Estos resultados, en su conjunto, mostraron que el reemplazamiento de la región codificante de *pprA* por el gen *pyrG* de *A. fumigatus* causaba la letalidad en los transformantes, siendo, por tanto, *pprA* un gen esencial en *A. nidulans*.

Con el fin de caracterizar el fenotipo terminal del alelo *ΔpprA* se realizó un análisis microscópico de la germinación de los conidios procedentes del heterocarionte en medio mínimo líquido selectivo. Tras 24h de incubación a 25°C fue posible observar germinación y crecimiento hifal de aquellos conidios portadores del alelo *ΔpprA* (los

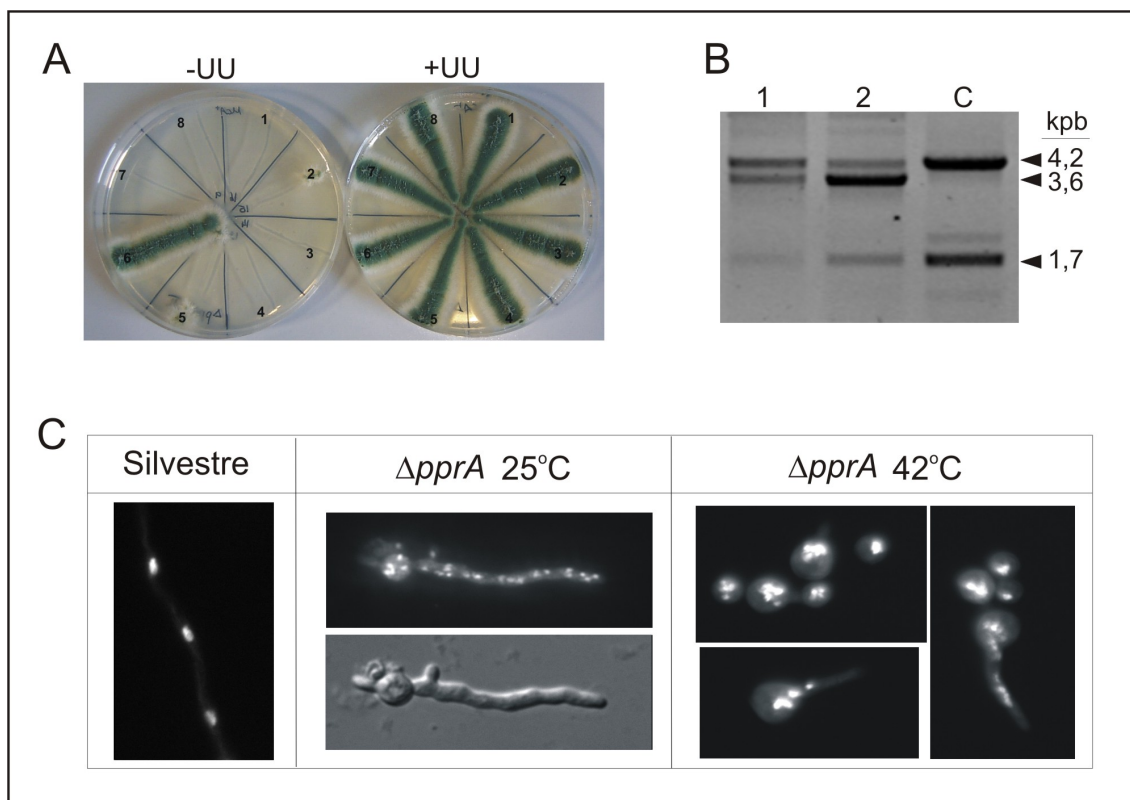


Figura A1.2: Caracterización del alelo *ApprA*. **A)** Conidiosporas procedentes de los transformantes obtenidos fueron incapaces de crecer en una placa de medio mínimo sin suplementar con pirimidinas (-UU) pero fueron capaces de formar colonias normales en una placa de medio mínimo suplementado con pirimidinas (+UU). **B)** Análisis de la heterocariosis mediante PCR. Se indica el tamaño de las bandas obtenidas en cada caso (ver texto para más detalle). **C)** Fenotipo microscópico de conidiosporas portadoras del alelo *ApprA* germinadas a 25° y 42°C en MMA durante 24 y 48h, respectivamente; comparadas con la cepa silvestre crecida a 25°C.

únicos capaces de crecer sin suplemento de pirimidinas). La utilización del colorante fluorescente DAPI puso de manifiesto la existencia de un elevado número de núcleos, localizados a lo largo de toda la hifa, distribuidos de forma aleatoria y muy diferente a la observada en la cepa silvestre; además, los núcleos mostraban tener un menor tamaño que los de la cepa silvestre (Fig. A1.2C). Dado el carácter termosensible del alelo mutante *pprA1* se decidió analizar la germinación de los conidios procedentes del heterocarionte a la temperatura restrictiva de 42°C. En estas condiciones, tras 24h de incubación, se observaron conidios germinados con un crecimiento isotrópico anómalo, que se han denominado conidios gigantes, algunos de los cuales emitían un pequeño tubo germinativo. La tinción con DAPI reveló la presencia de un elevado número de núcleos de tamaño reducido (Fig. A1.2C), que en la mayoría de los casos permanecían dentro del conidio sin migrar al tubo germinativo, a semejanza de la ausencia de migración nuclear descrita para los mutantes *nud*.

El elevado número de núcleos observado en los mutantes *pprA* parece indicar que los dos procesos fundamentales en el desarrollo de *A. nidulans*, división nuclear y crecimiento hifal, no están coordinados en ausencia de *pprA*, lo que estaría de acuerdo con la esencialidad de PprA. Basándonos en estas observaciones se podría establecer la hipótesis de que PprA participaría en el control del ciclo celular. Los fenotipos de acumulación de núcleos y crecimiento isotrópico anómalo han sido observados en los trabajos realizados entorno al mutante *AgapA*, un gen que codifica para una RasGAP que está implicada en el mantenimiento de la correcta organización del citoesqueleto de actina en la célula ²²⁹. Así mismo, el análisis del mutante *Δcdc42*, la quinasa dependiente de ciclina que regula el ciclo celular, reveló la existencia de un fenotipo muy similar, observándose una clara acumulación de núcleos en el citoplasma de la hifa ²³⁰.

4. Fenotipo de la mutación *pprA1*.

Como se ha mencionado en el apartado 1 de este apéndice, la presencia del alelo mutante *pprA1* causa la ausencia total de crecimiento colonial a 42°C. El análisis microscópico de la germinación de los conidios portadores del alelo *ΔpprA* confirmó el grave defecto de crecimiento observado de forma macroscópica. Tras 24h de incubación a la temperatura restrictiva (42°C) los conidios habían comenzado a germinar y a emitir el tubo germinativo, siendo, sin embargo, necesarias 48h de incubación para poder observar crecimiento hifal. Además de este retraso en el desarrollo, las hifas presentaban una morfología diferente a la observada en una cepa silvestre, siendo su grosor aproximadamente el doble que el de una hifa silvestre (Fig. A1.3A).

Utilizando como herramienta al factor de transcripción PacC se procedió a caracterizar *in vivo* el efecto de la proteína PprA1 en la distribución nuclear. La cepa utilizada en el experimento de mutagénesis expresaba el alelo PacC700 ⁶⁶, una forma con actividad transcripcional constitutiva de la proteína PacC (PacC(5-250)) fusionada a la proteína fluorescente GFP. La presencia de esta proteína quimérica permitía observar los núcleos *in vivo* y estudiar el efecto de PprA sobre el transporte nuclear. La observación de los conidios germinados a 42°C durante 48h con el microscopio de fluorescencia reveló la presencia de un elevado número de núcleos fluorescentes en el citoplasma (Fig. A1.3A). Se determinó el número de núcleos/micra en la cepa *pprA1* mutante y la silvestre. Con una muestra de hifas (n = 50) de ambas cepas se estableció

que en la cepa mutante hay el doble de núcleos (media=0.2 núcleos/micra) que en la cepa silvestre. Estos núcleos, al igual que ocurría en la cepa portadora del alelo *ΔpprA*, se disponían a lo largo de la hifa sin una distribución aparentemente organizada. Este hecho hizo pensar en la posibilidad de que la mutación *pprA1* estuviera afectando a los microtúbulos ya que son estos los encargados del correcto posicionamiento de los núcleos a lo largo de las hifas de *A. nidulans*²³¹.

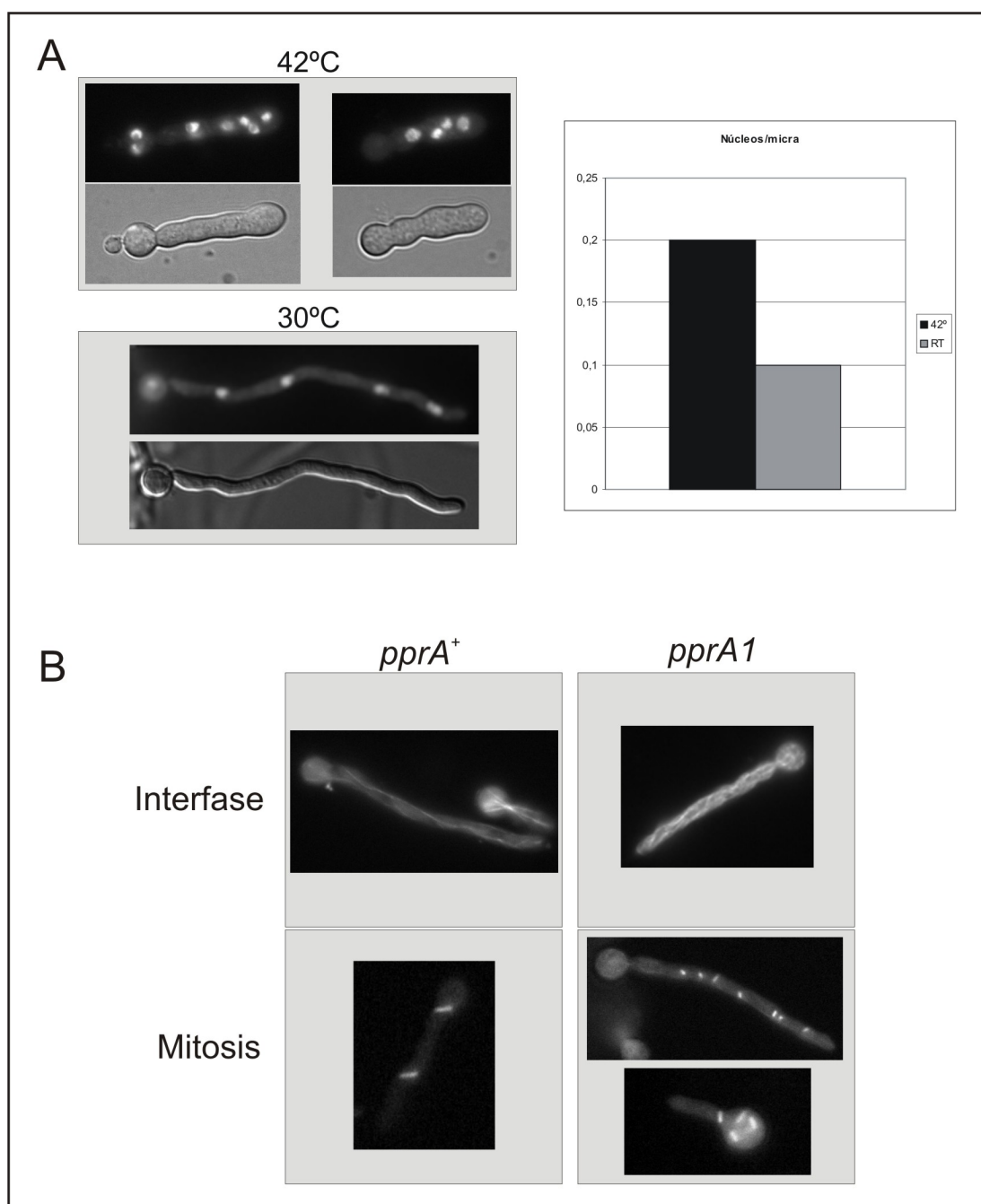


Figura A1.3: La mutación *pprA1* provoca un aumento en el número de núcleos y afecta a su distribución. **A)** Imágenes de una cepa portadora de la mutación *pprA1* y una cepa silvestre donde se observa la diferencia en el número de núcleos (visualizados gracias a la presencia de la proteína GFP::*PacC*(5-250)). El gráfico muestra cuantitativamente esta diferencia. **B)** Imágenes de una cepa que expresa la proteína quimérica TubA::*GFP* en un fondo genético silvestre o *pprA1*. En interfase es posible observar un mayor número de microtúbulos en la cepa mutante que en la silvestre. La diferencia más notable se produce durante la mitosis donde la presencia de la mutación provoca una defectuosa orientación de los husos mitóticos. En todos los casos las muestras fueron incubadas a 42°C.

4.1 Organización de la Tubulina α en la cepa *pprA1*.

Para estudiar la organización de los microtúbulos en un fondo genético *pprA1* se construyó, mediante cruzamiento génico, una cepa que expresaba la proteína Tubulina α (TubA) fusionada a GFP en un fondo *pprA1*. En la cepa mutante se observó la presencia de microtúbulos fluorescentes, aunque se apreciaba un mayor número de microtúbulos cuando los conidios fueron incubados a 42°C, teniendo un aspecto más disgregado que el observado en la cepa *tubA::gfp*, *pprA* silvestre (Fig. A1.3B). El estado de los microtúbulos durante el proceso de mitosis era de especial interés dado el drástico cambio que se produce en el citoesqueleto de microtúbulos durante la formación del huso mitótico⁴⁷. Como se observa en la figura A1.3B, a temperatura restrictiva, cuando los núcleos de una hifa portadora de la mutación *pprA1* entraron en mitosis se produjo la formación de los husos mitóticos si bien la orientación de estos fue diferente en cada núcleo, situación muy distinta a la observada en una cepa silvestre.

El correcto posicionamiento de los núcleos depende de la interacción de los microtúbulos que parten del SPB (“*spindle pole body*”) con proteínas situadas en la membrana (ApsA) así como de la interacción de microtúbulos procedentes de diferentes núcleos entre sí²³¹. La disgregación de los microtúbulos observada en la cepa *pprA1* podría deberse a la incapacidad de éstos para establecer este tipo de interacciones lo que a su vez explicaría la anómala distribución de los núcleos a lo largo de la hifa.

4.2 Efecto de la mutación *pprA1* sobre el citoesqueleto de actina.

Una vez determinado el efecto de la mutación sobre el citoesqueleto de microtúbulos se procedió a examinar el estado del citoesqueleto de actina mediante técnicas de inmuno-fluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos primarios anti-actina acoplados a un fluoróforo (ver apartado 8.1 de Materiales y Métodos). El anticuerpo detectó, en las células de la cepa silvestre, actina acumulada en la punta de la hifa, así como los denominados parches corticales y filamentos de actina (Fig. A1.4A), de

acuerdo con los resultado descritos por nuestro laboratorio y otros²³²⁻²³⁴ (ver apéndice 2 de esta tesis). En las células de la cepa *pprA1*, a temperatura restrictiva, era evidente la acumulación de actina en el ápice de la hifa, si bien esta acumulación era sensiblemente menor a la observada en la cepa silvestre. Sin embargo, no fue posible observar cables de actina. Los parches corticales en la zona distal del ápice eran numerosos y aparecían próximos a la membrana plasmática, lo que contrastaba con el número y la disposición dispersa observada en la cepa silvestre (Fig. A1.4A).

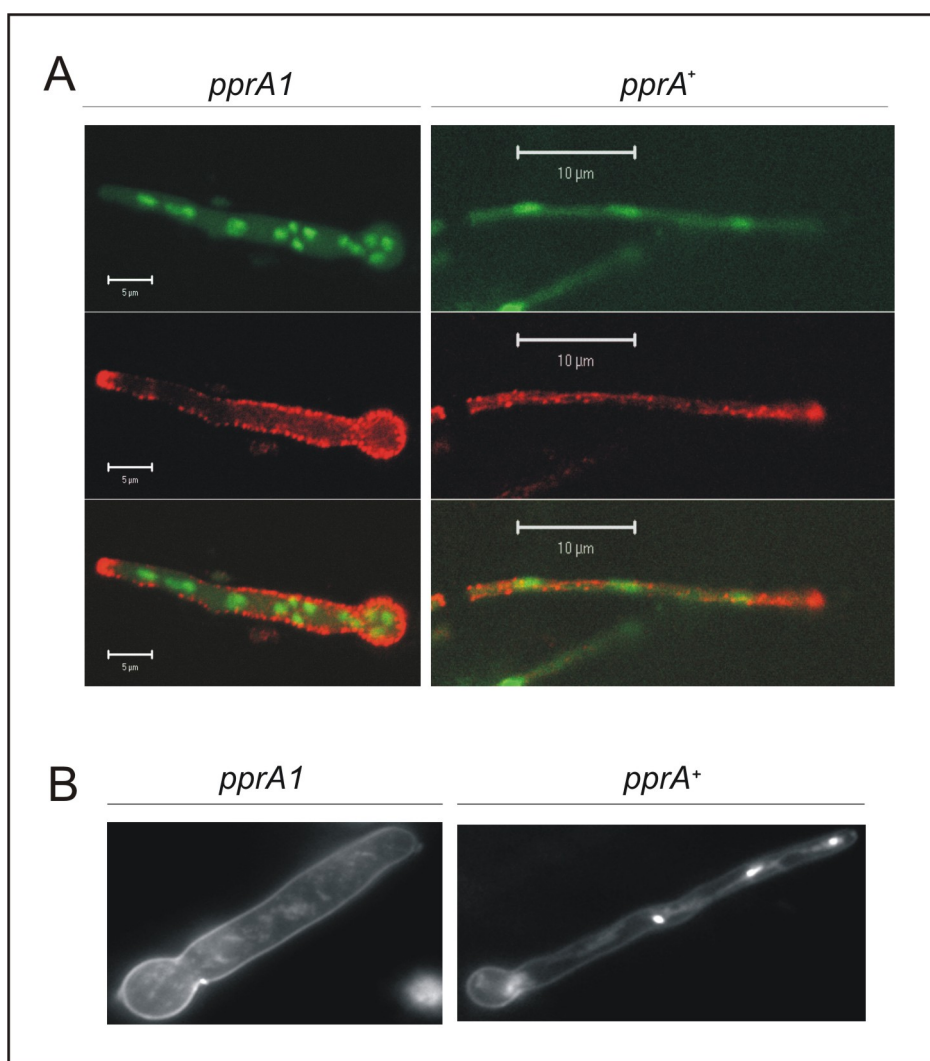


Figura A1.4: La mutación *pprA1* afecta al citoesqueleto de actina y a las mitocondrias. A) Estado del citoesqueleto de actina, detectado mediante inmunofluorescencia indirecta, en una cepa mutante *pprA1* en comparación con una cepa silvestre. En la cepa mutante no existen cables de actina. En verde aparecen los núcleos. **B)** Imágenes donde se observan las mitocondrias teñidas con Mitotracker. En la cepa mutante la morfología de las mitocondrias está muy alterada.

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que alteraciones del citoesqueleto de actina conducen a un incorrecto posicionamiento del núcleo y una errónea orientación de los

husos mitóticos lo que resulta en la aparición de células multinucleadas como consecuencia directa ^{235,236}. Las alteraciones del citoesqueleto observadas consistían básicamente en la ausencia o desarrollo defectuoso de los cables de actina, así como una distribución de parches de actina por toda la superficie de la célula ²³⁵. El fenotipo que presenta la cepa mutante *pprA1* es extremadamente parecido al que exhiben los anteriores mutantes en *S. cerevisiae*, por lo que se podría pensar que la mutación *pprA1* estaría afectando directamente al citoesqueleto de actina y que los demás fenotipos observados: elevado número de núcleos y orientación aberrante de los husos mitóticos, serían una consecuencia de ello. Quizá este defecto sobre el citoesqueleto de actina, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, sea suficiente para que *A. nidulans* no pueda “sentir” el volumen de citoplasma que tiene la hifa, lo que explicaría que se sigan produciendo mitosis sin que se haya producido el necesario incremento en el volumen celular. Según estos resultados quedaría descartada la hipótesis inicial en la que se proponía que *pprA* estuviera implicado en algún punto de control del ciclo celular, ya que parece más probable su relación directa con la organización del citoesqueleto de actina.

4.3 La mutación *pprA1* afecta a la integridad morfológica de las mitocondrias.

El citoesqueleto de actina es una estructura dinámica necesaria para el mantenimiento de la polaridad celular, la división nuclear y el tráfico de orgánulos ²³⁷⁻²⁴¹. En *A. nidulans*, la interacción entre las mitocondrias y el citoesqueleto de actina resulta esencial para la correcta distribución, movilidad y morfología de las mitocondrias ²⁴²⁻²⁴⁴.

Dado el defecto que causa la mutación *pprA1* en la organización del citoesqueleto de actina, se decidió estudiar la morfología de las mitocondrias en el mutante *pprA1*. Para poder observar las mitocondrias en el microscopio se utilizó MitoTracker (Invitrogen), un colorante que se une específicamente a la membrana mitocondrial. En una cepa silvestre las mitocondrias mostraron una morfología alargada (Fig. A1.4B), similar a la observada anteriormente por Suelmann et al. ²⁴⁴. Sin embargo, en las hifas de la cepa *pprA1* incubadas a 42°C el aspecto de las mitocondrias fue muy diferente, observándose pequeñas acumulaciones de fluorescencia por el citoplasma que se podrían interpretar como mitocondrias fragmentadas o de tamaño muy pequeño (Fig. A1.4B). Estos resultados demostraban que la ausencia de la proteína PprA funcional en

A. nidulans causa defectos en la integridad de las mitocondrias, posiblemente, como consecuencia directa de desorganizar el citoesqueleto de actina.

Consideraciones generales:

La búsqueda de mutantes afectados en el transporte nuclear ha conducido a la identificación de un gen esencial en *A. nidulans* en el que una mutación termosensible causa alteraciones en la distribución nuclear, el citoesqueleto de actina y la morfología de las mitocondrias. El análisis del fenotipo del alelo mutante *pprA1* parece indicar que esta proteína debe ejercer su función principalmente a nivel de la organización del citoesqueleto de actina pues los demás fenotipos observados: la alteración de la distribución nuclear y de la morfología de las mitocondrias, podían ser consecuencia directa o indirecta de la alteración del citoesqueleto de actina. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que el fenotipo directo que cause el mutante sea la alteración de las mitocondrias dada la relación que en plantas tienen este tipo de proteínas con mitocondrias y cloroplastos.

El estudio de los mecanismos de acción de PprA en la célula se ha visto dificultado por problemas en la determinación de la localización de la proteína, la búsqueda de interactores o proteínas accesorias mediante técnicas de proteómica, así como el efecto de la sobre-expresión de formas etiquetadas de PprA:

1.- El estudio de la localización subcelular de PprA se abordó siguiendo las técnicas clásicamente utilizadas en el laboratorio: el etiquetado C-terminal de la proteína con GFP. El análisis mediante Western Blot con anticuerpos anti-GFP de un extracto total de proteínas de la cepa que expresaba PprA::GFP permitió detectar la proteína; sin embargo, no fue posible observar fluorescencia de esta quimera. Consecuentemente se decidió expresar diferentes formas etiquetadas de PprA bajo control de su propio promotor en el plásmido autorreplicativo pRG3-AMA1. Para comprobar que la proteína que estaba siendo expresada a partir del plásmido era funcional, se transformaron los plásmidos en una cepa con fondo genético *pprA1*. Tanto la proteína PprA::GFP como GFP::PprA expresadas a partir del plásmido autorreplicativo fueron capaces de complementar la mutación, sin embargo, no fue posible observar fluorescencia. Adicionalmente, se expresó la proteína PprA::GFP bajo el control del promotor inducible por etanol, *alcA^P*, siendo también imposible observar fluorescencia en ninguno de los transformantes obtenidos, tanto en aquellos que portaban una copia simple como en los que tenían múltiples copias de la construcción.

2.- En el análisis de los niveles de expresión del gen mediante RT-PCR no se detectó ninguna diferencia entre la expresión de *pprA* y la expresión del gen utilizado como control (actina). Sin embargo, mediante Northern Blot tan solo fue posible detectar el transcrito bajo condiciones de sobre-expresión (Fig. A1.5). Adicionalmente, parecía existir degradación de dicho transcrito, lo que sugiere la existencia de mecanismos de control post-transcripcionales para impedir que se produzca un aumento en los niveles de proteína, hecho que explicaría la ausencia de detección de la proteína etiquetada con GFP en microscopía.

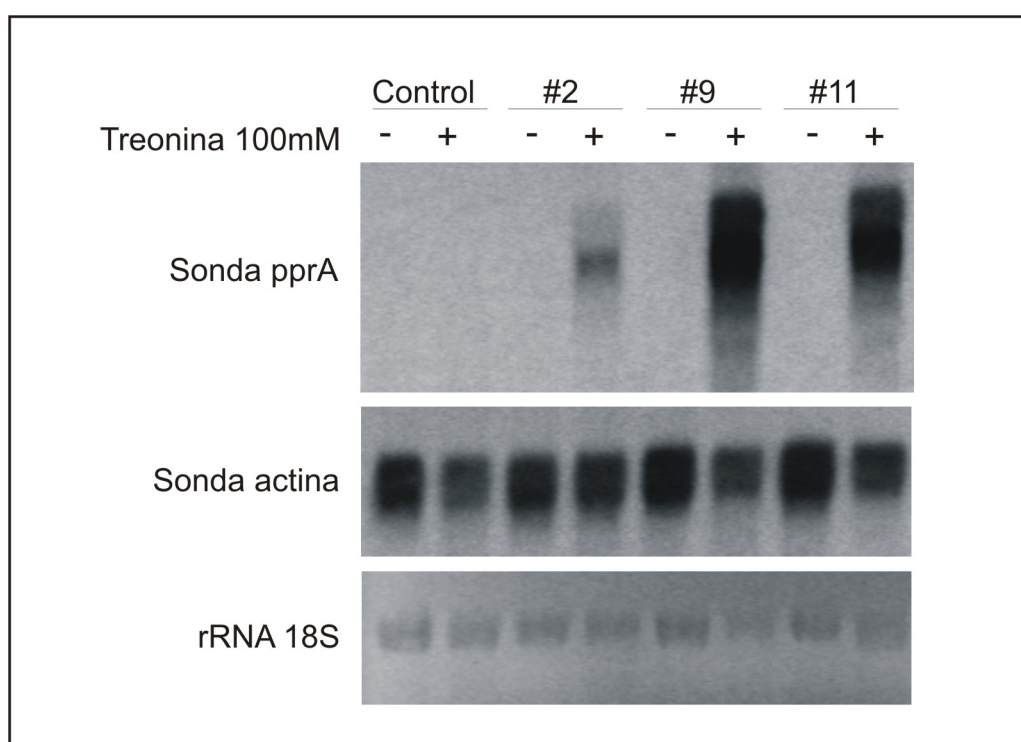


Figura A1.5: Análisis de los niveles de expresión de *pprA*. Los transformantes con la construcción *alcA^P::pprA::gfp* se cultivaron en medio mínimo de *Aspergillus* 16h a 37°C en condiciones de represión para *alcA^P* (1% fructosa como fuente de carbono). El micelio resultante se transfirió a medio mínimo fresco conteniendo 100mM treonina y se cultivó durante 2,5h más. Se aisló el RNA de las muestras de micelio recogidas tras los cultivos en condiciones de represión (- treonina) e inducción (+ treonina). Los niveles de transcrito de *pprA* se analizaron por el método de Northern Blot. La membrana se rehibridó con la sonda del transcrito de actina como control de la equivalencia de cargas de RNA en los distintos carriles. En el panel inferior se muestran los rRNAs de 18S.

3.- Una de las técnicas utilizadas para localizar subcelularmente las proteínas PPR en *S. cerevisiae* ha sido el fraccionamiento subcelular y posterior detección de la proteína con anticuerpos específicos ²⁴⁵. Utilizando la cepa de *A. nidulans* que expresaba la proteína PprA::GFP se realizó un fraccionamiento subcelular con el fin de

obtener alguna información sobre la localización subcelular de la proteína. Para obtener las diferentes fracciones se siguió el protocolo descrito por S.D.Emr²⁴⁶ y para detectar la proteína se utilizaron anticuerpos anti-GFP, siendo posible detectar la proteína únicamente en la fracción correspondiente al extracto total. Estos resultados no permitieron obtener ningún dato más sobre la localización subcelular de la proteína.

4.- Por último, en la búsqueda de interactores o proteínas accesorias mediante técnicas de proteómica se consiguió identificar la actina como una de las proteínas capaces de interactuar con PprA. Sin embargo, al tratar de repetir esta interacción en ensayos de co-inmunoprecipitación no se obtuvo ningún resultado positivo.

Endocitosis y crecimiento polar en *Aspergillus nidulans*

APÉNDICE 2

INTRODUCCIÓN.

La actina desempeña un importante papel en la endocitosis, proceso por el cual las células eucariotas internalizan porciones de membrana plasmática así como las proteínas asociadas a ella. En la levadura *S. cerevisiae* el proceso de endocitosis es dependiente de actina y a él están asociadas dos estructuras corticales de diferente composición y movilidad. Por un lado aparecen los parches de actina, estructuras móviles de composición proteica variable que marcan puntos de la membrana plasmática donde tienen lugar procesos de endocitosis dependientes de clatrina ^{237,247}. Por otro lado la endocitosis también está asociada a unas estructuras estáticas denominadas eisosomas compuestas principalmente por dos proteínas, Pil1 y Lsp1 ²⁴⁸.

En *S. cerevisiae* y *S. pombe* el crecimiento polar está asociado con la polarización de los parches de actina. Estas estructuras señalan sitios de endocitosis, lo que sugiere que el crecimiento polar no sólo implica una ruta de secreción sino también procesos de endocitosis próximos a la zona de crecimiento ²⁴⁹. Un ejemplo extremo de crecimiento polarizado es el que tiene lugar en el crecimiento hifal de los hongos filamentosos ²⁵⁰. Tras un periodo de crecimiento isotrópico, se establece el eje de polaridad en la conidiospora y se desencadena la emisión de un tubo germinativo que crece por extensión apical. Este crecimiento es posible gracias al posicionamiento en un punto concreto de la célula de los procesos de secreción y refleja la polarización del citoesqueleto de microtúbulos, el cual es utilizado para el transporte de las vesículas secretoras hacia el ápice de la hifa ^{251,252}. El crecimiento polar es también el responsable de la formación de un orgánulo denominado Spitzenkörper que actúa como un centro donador de vesículas ²⁵³. En este orgánulo existen filamentos de actina que son los encargados de transportar las vesículas o moléculas, que han llegado a la región subapical vía microtúbulos, hasta el ápice de la hifa ²⁵⁴.

La progresión del crecimiento hifal implica la continua llegada de vesículas secretoras al ápice de la hifa ²⁵⁴⁻²⁵⁷. La incesante adición de lípidos y proteínas en el extremo de la hifa implica que, para mantener la elevada velocidad de crecimiento característica de los hongos filamentosos, debe existir un mecanismo que asegure que el exceso de membrana y proteínas de la maquinaria de fusión de vesículas sea eficientemente redistribuido. El hecho de que el Spitzenkörper de diversos hongos pueda ser teñido con el colorante FM4-64 ²⁵⁸ sugiere que, como se ha demostrado en la fase de crecimiento polar de *S. cerevisiae* ²⁵⁹, el reciclaje continuo de membranas hacia un compartimento endosomal debe estar íntimamente asociado con el crecimiento

polarizado de la hifa. En este sentido el grupo del Dr. Steinberg ha demostrado la existencia de un compartimento endosomal en la punta de las hifas de *Ustilago maydis*^{260,261}. La proximidad de este compartimento al ápice de la hifa y trabajos realizados con el cargo endocítico Pra1 llevan a proponer un modelo en el cual los procesos de endocitosis predominarían en la región apical de la hifa donde este compartimento contribuiría al crecimiento hifal mediante el continuo reciclaje de membranas y proteínas²⁵⁷. Si la endocitosis predomina en las regiones apicales, la maquinaria endocítica debe estar también fuertemente polarizada.

Al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, el citoesqueleto de actina en *A. nidulans* está formado por filamentos de actina y parches corticales de actina. Estos parches de actina están altamente polarizados, siendo más abundantes en la punta de la hifa²⁵⁴. Con el objetivo de demostrar que la polarización de los parches de actina conlleva la polarización de la maquinaria de endocitosis en *A. nidulans* se han identificado los ortólogos de tres proteínas que forman parte del parche de actina en *S. cerevisiae*, Abp1p, Rvs167p y Sla2p. Abp1p, un regulador negativo del complejo Arp2/3, se eligió como marcador prototípico de lugares donde ocurre la endocitosis debido a que no está asociado a cables de actina y a que se localiza exclusivamente en parches de actina²⁶². Sla2p es un componente temprano de los parches de actina y regula la asociación de la pre-vesícula endocítica con elementos polimerizadores de actina para llevar a cabo la internalización de la vesícula²⁶³. Rvs167p está implicado en los procesos de escisión de las vesículas gracias a su capacidad para unirse a membranas de curvatura negativa²⁴⁷. El trabajo realizado ha demostrado que los ortólogos de estas tres proteínas, AbpA (Abp1p), AmpA (Rvs167p) y SlaB (Sla2p), se localizan preferentemente en la punta de la hifa, en una posición ligeramente subapical, dejando libre la zona donde deben producirse los procesos de secreción. Además sugiere que la asociación espacial de procesos de exocitosis y endocitosis en la punta de la hifa es responsable de la progresión del crecimiento hifal.

RESULTADOS.

1. Caracterización de *abpA*, el homólogo de *abp1* en *A. nidulans*.

Para identificar el ortólogo de *abp1* en *A. nidulans* se realizaron búsquedas de similitud de secuencias (tBLASTn) utilizando la secuencia de aminoácidos de Abp1p. Se halló sólo una proteína en el genoma de *A. nidulans* con un alto nivel de similitud en su secuencia de aminoácidos a Abp1p, la proteína codificada por el locus AN8873.3.

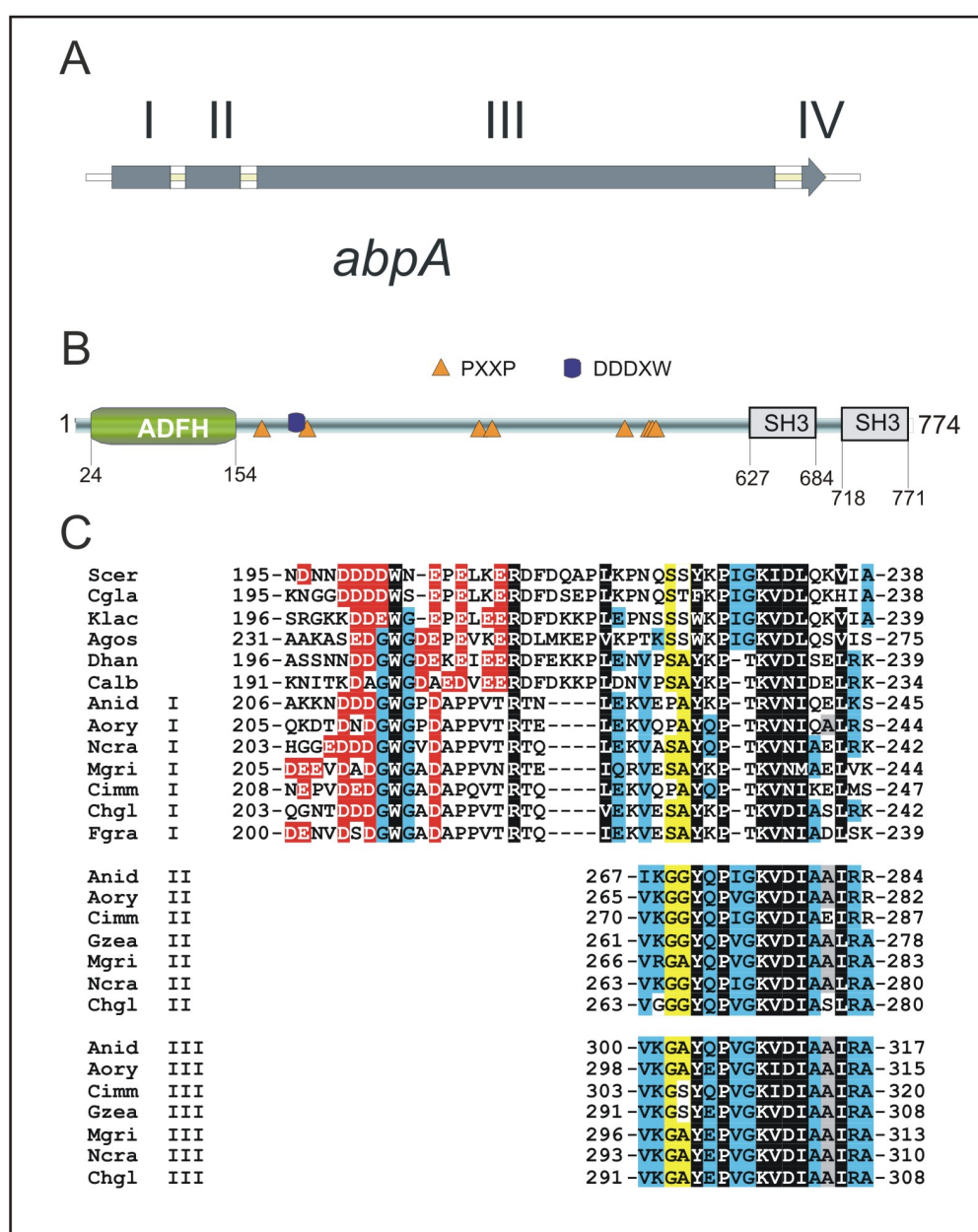
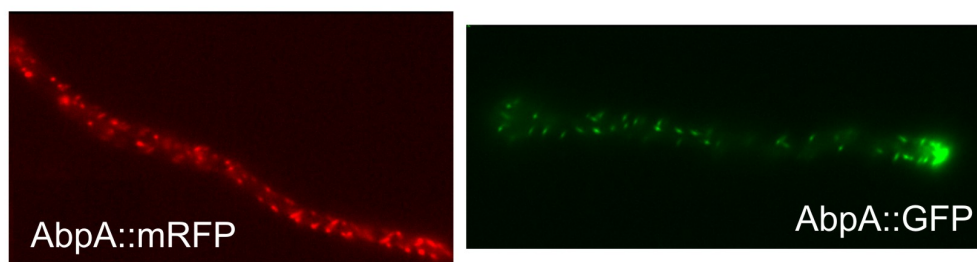


Figura A2.1: Caracterización de *abpA*, el ortólogo de *abp1* en *A. nidulans*. **A)** Representación esquemática de la región codificante de *abpA*. Los bloques en blanco representan la posición de los intrones. **B)** Representación esquemática de los dominios estructurales presentes en AbpA. **C)** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los homólogos fúngicos de Abp1p correspondiente a la región donde se localiza el grupo de residuos DDDXW más amino-terminal de Abp1p (sombreado en rojo). Los residuos totalmente conservados (según Blosum62) están sombreados en negro. Las sombras azules indican una conservación >50%. En amarillo aparecen sombreados los residuos de Ser, Ala o Gly. El grupo de 12 residuos altamente conservados que está asociado al motivo DDDXW está repetido tres veces en el caso de los hongos filamentosos. Las abreviaturas corresponden a: Scer, *Saccharomyces cerevisiae*; Cgla, *Candida glabrata*; Klac, *Kluyveromyces lactis*; Agos, *Ashbya gossypii*; Dhan, *Debaryomyces hansenii*; Calb, *Candida albicans*; Anid, *Aspergillus nidulans*; Aory, *A. oryzae*; Ncra, *Neurospora crassa*; Mgri, *Magnaporthe grisea*; Cimm, *Coccidioides immitis*; Chal, *Chaetomium globosum*; Agra, *Fusarium graminearum*.

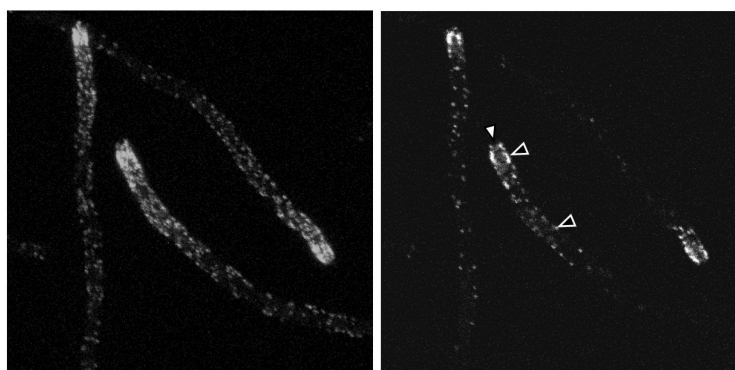
Este gen se localiza en el brazo derecho del cromosoma VII y ha sido denominado *abpA* (Fig. A2.1A). La comparación de las versiones genómica y DNA codificante reveló que la región codificante de este gen está dividida en cuatro exones y codifica para una proteína de 774 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 82,8kDa. Esta proteína guarda un 24% de identidad y un 40% de similitud con Abp1p y en ella se pueden distinguir los dominios característicos de este tipo de proteínas (Fig. A2.1B). Al igual que Abp1p, AbpA contiene en su extremo N-terminal un dominio ADFH (“Actin Depolymerising Factor Homology”), entre los residuos 24 y 154, capaz de unir filamentos de actina; y en su extremo C-terminal presenta un dominio SH3 (entre los residuos 718 y 771). A diferencia de lo que ocurre en Abp1p y otros ortólogos de levaduras, AbpA contiene un dominio SH3 adicional, situado entre los residuos 627 y 684. Esta característica es compartida con los posibles homólogos de AbpA en otros hongos filamentosos, tal y como se pudo observar realizando alineamientos múltiples. En la secuencia de aminoácidos de AbpA se pueden distinguir además varios motivos PXXP (Fig. A2.1B). En Abp1p estos motivos están implicados en la interacción con Rvs167p²⁶⁴ y Sla1p²⁶⁵ por lo que podrían estar implicados en la interacción de AbpA con proteínas de la maquinaria endocítica que contienen en su secuencia dominios SH3. Abp1p contiene dos grupos de residuos ácidos (DDDXW) implicados en la activación del complejo Arp2/3 sin embargo, en AbpA tan sólo está conservado el motivo en la posición más N-terminal (Fig. A2.1B y C). En la comparación de las secuencias de los homólogos fúngicos de AbpA se observó que el motivo DDDXW está asociado a un grupo de 12 residuos altamente conservados el cuál está repetido tres veces (Fig. A2.1C).

Figura A2.2: AbpA se localiza en parches corticales móviles. **A)** Localización subcelular de las quimeras AbpA::mRFP y AbpA::GFP. **B)** Imagen de la izquierda, máxima proyección de la serie de imágenes tomadas en diferentes planos z (vídeo 10). Imagen de la derecha, imagen correspondiente a un plano central donde se puede observar la localización cortical de los parches de AbpA::GFP (puntas de flecha vacías) y la ausencia de AbpA en el ápice de la hifa (punta de flecha blanca). **C)** Tiempo de vida de los parches de AbpA. Se muestra el movimiento de cinco parches representativos tomados de la imagen que aparece en el interior del gráfico (vídeo 11).

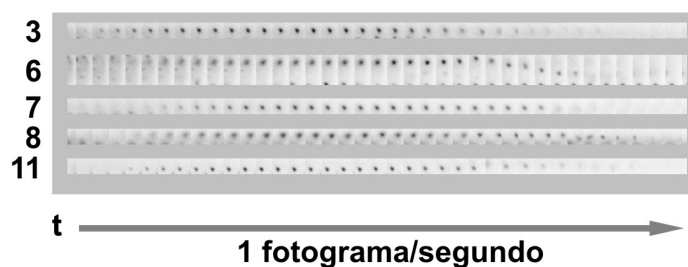
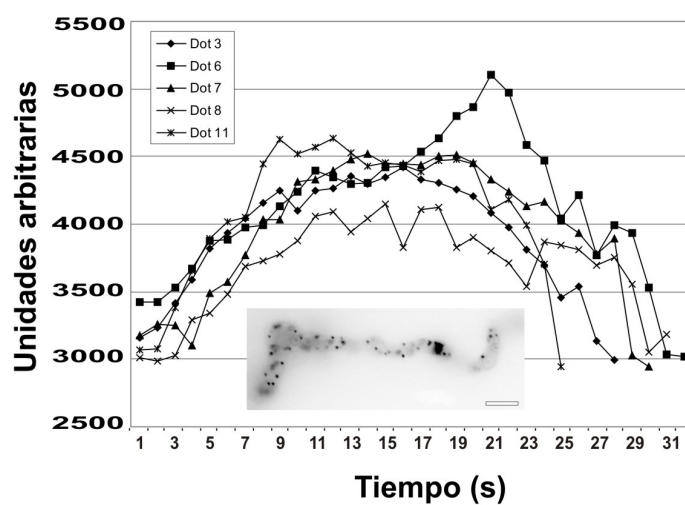
A



B



C



1.1 Generación y análisis del alelo nulo de *abpA*.

Para caracterizar funcionalmente el gen *abpA*, se generó su alelo nulo mediante reemplazamiento génico sustituyendo la región codificante del *locus abpA* por el gen *pyrG* de *A. fumigatus*. Para ello se generó mediante PCR de fusión una construcción consistente en el gen *pyrG* de *A. fumigatus* (*pyrG^{Afum}*) flanqueado por el promotor y el terminador de *abpA*. Esta construcción se transformó en la cepa MAD1425 portadora de la mutación *pyrG89*. Los transformantes se seleccionaron por prototrofia a pirimidinas y el reemplazamiento génico fue confirmado mediante Southern-blot. Similar al fenotipo de la delección de *abp1* en *S. cerevisiae*, las cepas portadoras del alelo nulo de *abpA* mostraron un fenotipo indistinguible al de la cepa silvestre cuando fueron incubadas a diferentes temperaturas 25°C, 37°C y 42°C, y medios de cultivo.

Para determinar si el alelo $\Delta abpA$ provocaba algún defecto en la ruta de endocitosis se utilizó el colorante FM4-64, que se une a los fosfolípidos de la membrana y permite así seguir el proceso de internalización de membranas⁷³. Sin embargo, no se pudo detectar ninguna alteración en el tránsito de membranas por lo que se concluyó que el alelo $\Delta abpA$ no causaba ningún defecto a este nivel. Estos resultados mostraban que AbpA no desempeña una función esencial en el proceso de endocitosis y/o sugiere que su función podría ser llevada a cabo por otras proteínas. Concretamente, en *S. cerevisiae* la función de Abp1p solapa con la de Sla1p, Sla2p y Sac6p^{266,267}.

2. Localización subcelular de AbpA.

Para estudiar la localización subcelular de AbpA se generaron dos versiones etiquetadas de esta proteína, por un lado se generó una proteína quimérica AbpA::mRFP y por otro una proteína AbpA::GFP; con el fin de comparar los resultados obtenidos en ambos casos y poder ser utilizadas con las diferentes herramientas disponibles en el laboratorio (ver resultados más adelante). Se reemplazó la región codificante del *locus abpA* por la construcción *abpA::mrfp::pyrG^{Afum}*, para conseguir una cepa que expresara la proteína AbpA::mRFP, o bien por la construcción *abpA::gfp::pyrG^{Afum}*, para conseguir una cepa que expresara la proteína AbpA::GFP. En ambos casos los transformantes fueron analizados por Southern-blot para verificar que se había producido el correcto reemplazamiento génico.

La observación de las cepas que expresaban cada una de las proteínas quiméricas con el microscopio de epifluorescencia reveló la existencia de puntos fluorescentes localizados por toda la hifa aunque se evidenció rápidamente que existía

una mayor acumulación de éstos en la punta de la misma (Fig. A2.2A). Con la ayuda de un microscopio confocal se pudo determinar que estos puntos fluorescentes no estaban en el interior de la célula sino que se localizaban en la periferia de la hifa, patrón similar al observado para los denominados parches de actina. Además, se pudo observar que la acumulación apical de fluorescencia no llegaba hasta el ápice de la hifa, existiendo una zona de exclusión de la fluorescencia en la región donde se debería localizar el Spitzenkörper (Fig. A2.2B y vídeo 10). Para determinar la capacidad de internalización de membranas en diferentes tipos celulares, se midió el número de parches de AbpA tanto en células apicales como en compartimentos subapicales que fue de 0,8 parches/micra en ambos casos, por lo tanto, la presencia de parches de AbpA en ambos tipos de células indicaba que la endocitosis también es activa a un nivel similar en compartimentos subapicales, lo que estaba de acuerdo con los resultados obtenidos utilizando FM4-64 tanto en *N. crassa* como en *A. nidulans*^{73,258}.

El análisis de las muestras *in vivo* reveló que los puntos fluorescentes no eran estáticos, sino como era esperado, dado que marcan un proceso dinámico, se desplazaban por el citoplasma (vídeo 11). En este movimiento se podían diferenciar dos fases. Una fase inicial en la que el punto fluorescente realizaba cortos movimientos dentro del mismo plano focal y una segunda fase en la que el punto se movía rápidamente hacia el interior del citosol, alejándose del plano focal original. El tiempo transcurrido desde la aparición de un punto en la membrana de la hifa hasta su desaparición fue de 24 ± 5 segundos ($n = 20$), un poco mayor al observado estudiando Abp1p en la levadura²⁶³. En la figura A2.2C se muestran cinco ejemplos representativos de parches de AbpA donde se pueden observar los dos tipos de movimientos y el tiempo de vida medio de cada parche.

2.1 Los parches de AbpA colocalizan con los parches de actina.

Con el fin de analizar si los puntos fluorescentes observados en las cepas que expresaban las formas etiquetadas de AbpA formaban parte de los denominados parches de actina se comparó su distribución en la hifa con la distribución de la actina. Para detectar el citoesqueleto de actina se realizó una inmuno-localización indirecta utilizando un anticuerpo primario anti-actina acoplado a un fluoróforo (ver sección 8.1 de Materiales y Métodos) en la cepa que expresaba AbpA::GFP. La localización subcelular observada para la actina fue similar a la observada en trabajos previos^{233,234}, apareciendo parches distribuidos por toda la superficie de la hifa y filamentos que

parecían contactar con diferentes parches corticales (Fig. A2.3A). Adicionalmente, se pudo observar que, al igual que ocurría en AbpA, la acumulación de actina observada en la punta de la hifa dejaba libre el ápice (Fig. A2.3B). La observación conjunta de actina y AbpA::GFP reveló que ambas proteínas compartían el mismo patrón de distribución, observándose colocalización tanto en la punta de la hifa como entre parches aislados (Fig. A2.3C). Adicionalmente, estos resultados pusieron de manifiesto que AbpA::GFP no aparece relacionada con los cables de actina.

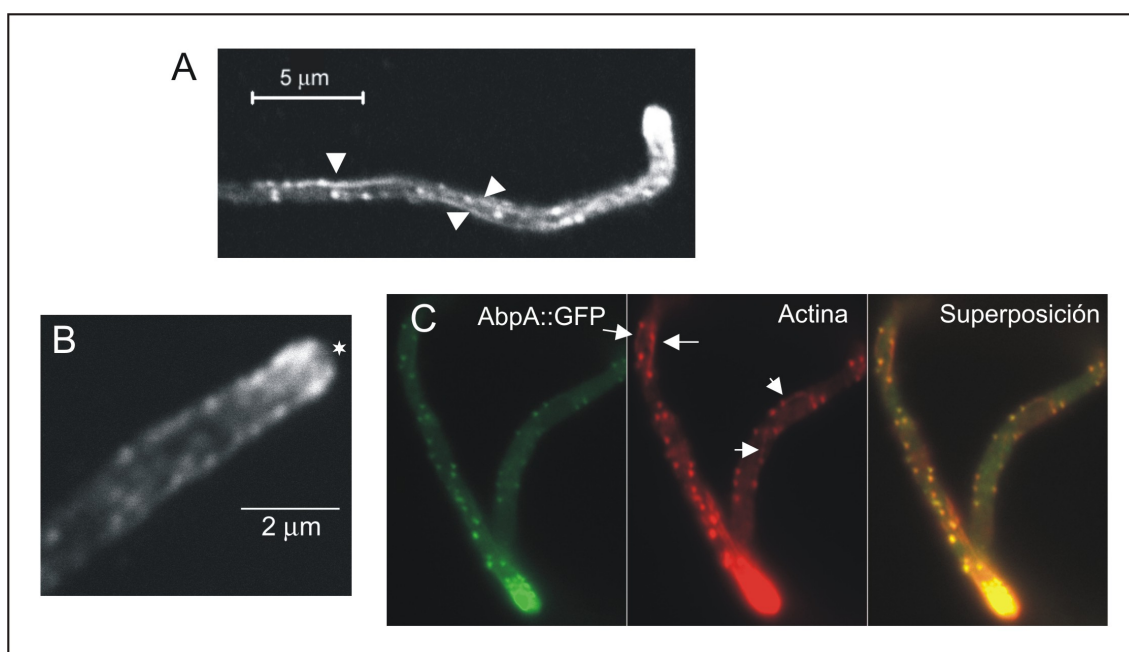


Figura A2.3: AbpA colocaliza con parches de actina pero no con cables de actina. **A)** Citoesqueleto de actina de *A. nidulans* visualizado con inmunofluorescencia indirecta. Las puntas de flecha señalan los cables de actina. **B)** Detalle de la acumulación de parches de actina en la punta, dejando libre el ápice de la hifa (asterisco). **C)** AbpA::GFP colocaliza con los parches de actina pero no con los cables (indicados con una flecha).

2.2 La localización subcelular de AbpA depende de F-actina pero no de la presencia de microtúbulos.

Abp1p es capaz de interactuar con filamentos de actina a través de su dominio ADFH, siendo esta interacción necesaria para la localización de Abp1p en parches corticales *in vivo*²⁶⁸. Para determinar si la distribución de AbpA en parches corticales era dependiente de la presencia de filamentos de actina se analizó la localización subcelular de la quimera AbpA::mRFP en presencia de la droga Latrunculina B (LatB) que provoca la despolimerización de los filamentos de actina. La incubación de hifas de la cepa que expresaba la proteína AbpA::GFP en medio mínimo de *Aspergillus*

conteniendo 100 μ M de LatB provocó un cambio drástico en la localización subcelular de AbpA, redistribuyéndose la fluorescencia por todo el citoplasma de la hifa en lugar de aparecer en forma de parches corticales (Fig. A2.4B comparada con A, control). Por el contrario, el tratamiento con benomilo, un compuesto desestabilizador de microtúbulos, no tuvo ningún efecto sobre la localización de AbpA (Fig. A2.4C comparada con A). La necesidad de energía en el proceso se hizo evidente al tratar las muestras con una mezcla de azida y NaF, que privan a la célula de energía, observándose la aparición de acumulaciones de fluorescencia de gran tamaño (Fig. A2.4D comparada con A), lo que indicaba que AbpA se mantenía en estructuras corticales estando, por lo tanto, el proceso de endocitosis de la membrana plasmática bloqueado.

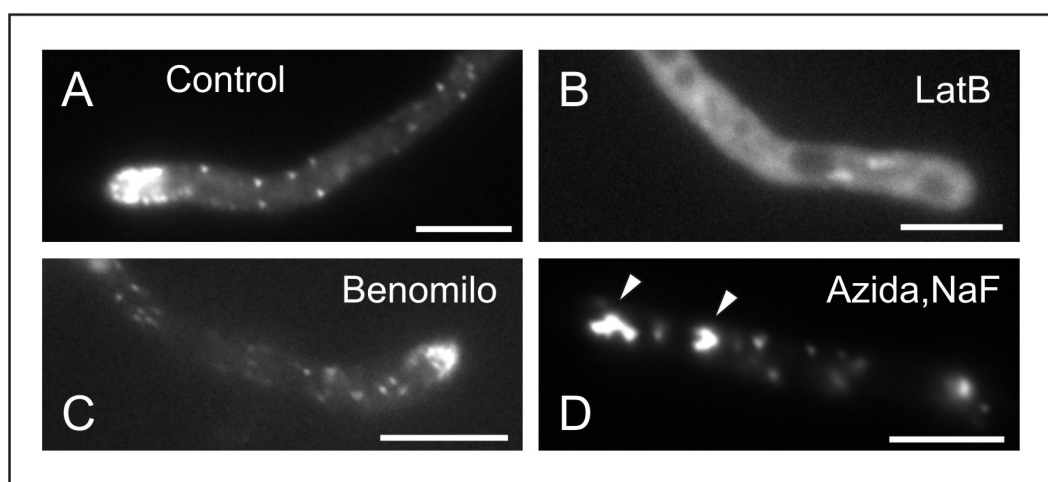


Figura A2.4: La localización de AbpA en parches corticales es dependiente de F-actina. Germínulas de una cepa que expresaba AbpA::mRFP fueron incubadas durante 10-15 minutos en presencia de los siguientes compuestos: **A)** Control, ningún tratamiento; **B)** latrunculina B 100 μ M; **C)** benomilo 3 μ g/ml; y **D)** 15mM azida más 15mM NaF. Barra = 5 μ m.

2.3 Los parches de AbpA se distribuyen de forma aleatoria durante el crecimiento isotrópico y se polarizan una vez emitido el tubo germinativo.

A la vista de la marcada polarización que presentaba la maquinaria endocítica (actina y AbpA) en germínulas e hifas, se decidió seguir la distribución de AbpA::mRFP a lo largo de todo el crecimiento hifal. Cuando las conidiosporas dejaron atrás su estado de latencia y entraron en una fase de crecimiento isotrópico fue donde únicamente se percibió una distribución aleatoria de AbpA (Fig. A2.5A). Una vez establecida la polaridad se observó el comienzo de la emisión del tubo germinativo,

pasando AbpA ha localizarse de forma más destacada en la punta de dicho tubo (Fig. A2.5B). A medida que fue creciendo el tubo germinativo, AbpA siguió presentando una distribución marcadamente polar (Fig. A2.5C-E). Adicionalmente, fue posible observar acumulaciones de AbpA en aquellos puntos en los que se empezaba a generar una ramificación (Fig. A2.5F) o en la punta del tubo germinativo secundario que emergía en la posición opuesta a la del primero (Fig. A2.5G). Estos resultados indicaban que el crecimiento polar está correlacionado con la polarización de la endocitosis.

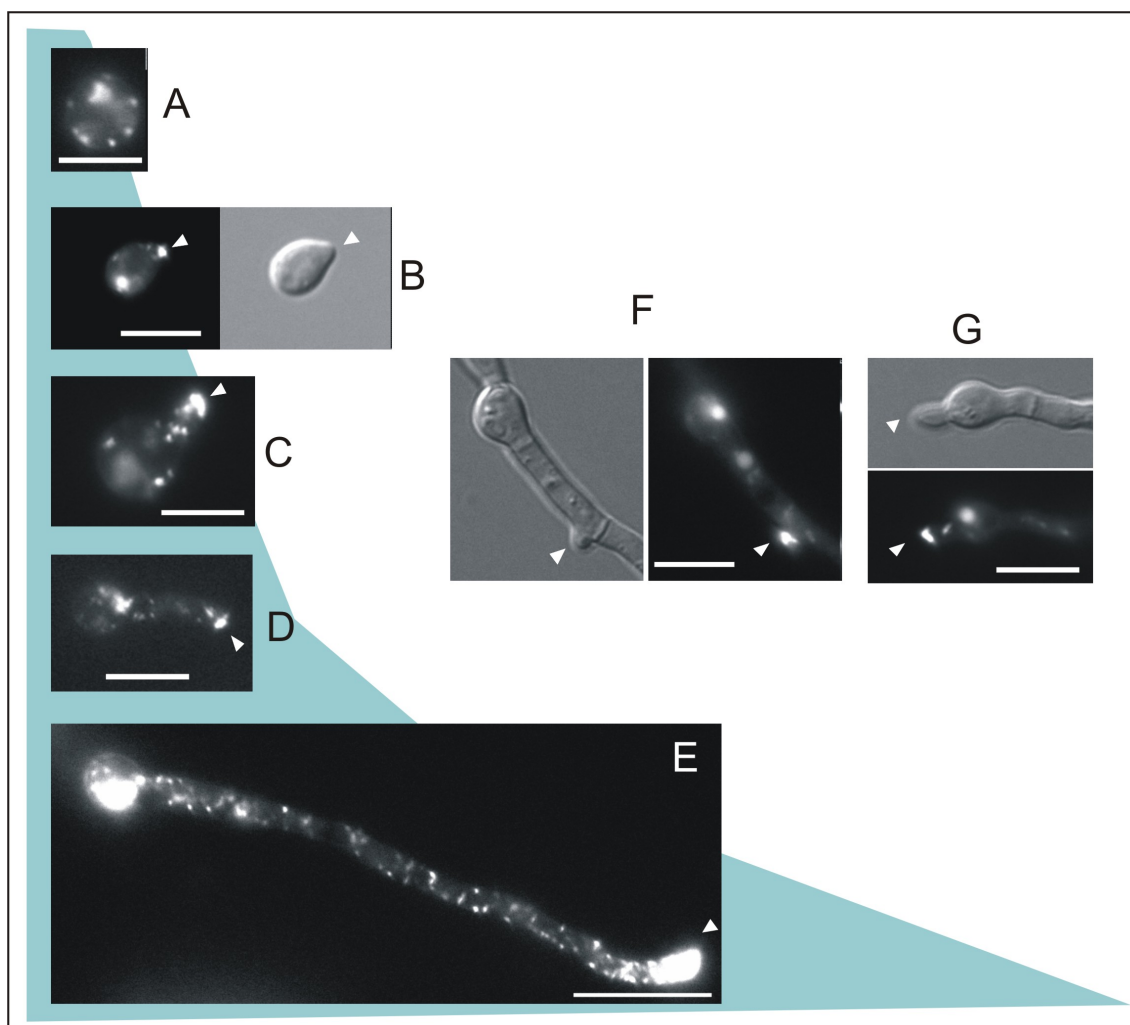


Figura A2.5: Localización subcelular de AbpA::mRFP en diferentes estados de la morfogénesis hifal. A) Conidiospora hinchada; B) fase inicial de la emisión del tubo germinativo una vez establecida la polaridad; C, D y E) germínulas de mayor tamaño; F) ejemplo de formación de una rama y G) emisión de un segundo tubo germinativo. Las puntas de flecha indican la zona donde se acumula AbpA::mRFP. Barra = 5μm.

3. AmpA, el ortólogo de la amfifisina Rvs167p en *A. nidulans*, también presenta una distribución polarizada.

S. cerevisiae tiene dos proteínas de tipo anfifisina caracterizadas por la presencia de un dominio BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs), Rvs161p y Rvs167p. Estas dos proteínas forman un complejo que se cree está implicado en los procesos de escisión de membranas durante la internalización de la vesícula endocítica, gracias a la capacidad del dominio BAR de unirse a membranas lipídicas con curvatura negativa ²⁶⁹. De acuerdo con esto, Kaksonen *et al.* demostraron que en un mutante $\Delta rvs167$ el 25% de los parches de endocitosis mostraban un defecto en la escisión de la membrana tras la invaginación mediada por actina. Rvs167p se localiza en parches corticales de forma dependiente de F-actina ²⁴⁷ y puede ser considerado como un buen marcador de endocitosis.

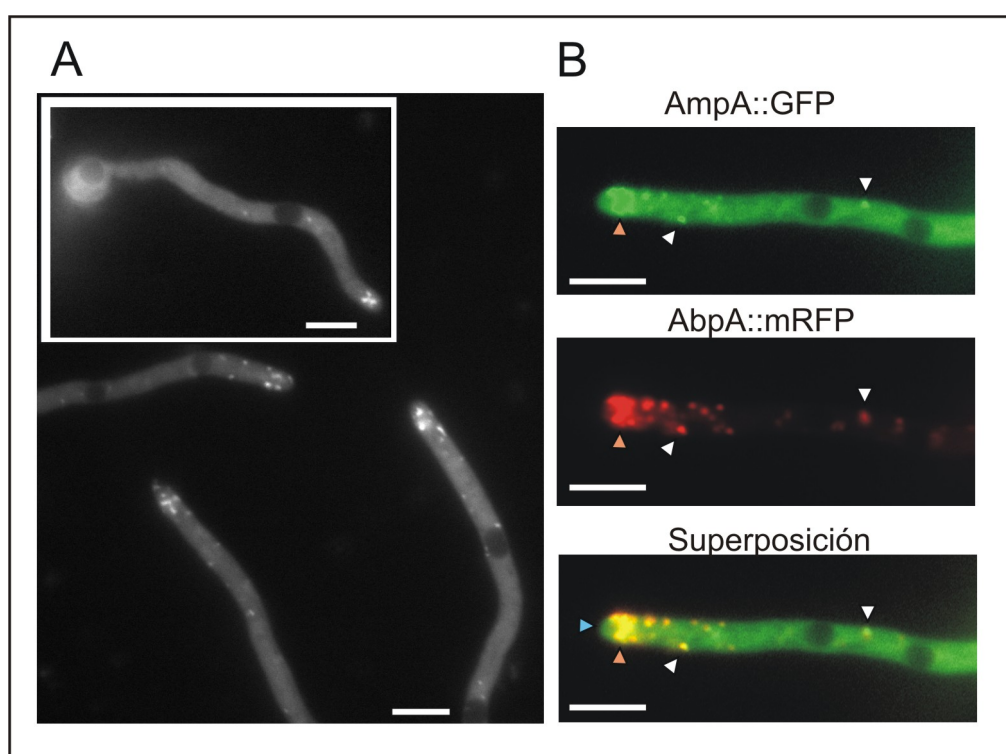


Figura A2.6: AmpA colocaliza con AbpA en la punta de la hifa. A) Localización subcelular de AmpA::GFP donde se puede observar una mayor acumulación de puntos fluorescentes en la punta de la hifa. **B)** Colocalización de AmpA::GFP con AbpA::mRFP. Las puntas de flecha blancas señalan dos puntos aislados que colocalizan; la punta de flecha naranja indica la región donde se localiza el anillo subapical donde se localizaría la maquinaria endocítica; la punta de flecha azul señala el ápice de la hifa que queda vacío de fluorescencia. Barra = 5µm.

A. nidulans también contiene en su genoma los dos genes que codifican para los ortólogos de Rvs167p y Rvs161p, los cuales han sido denominados AmpA (AN2516) y

AmpB (AN8831), respectivamente ²⁷⁰. El análisis con el microscopio de fluorescencia de una cepa que expresaba la proteína quimérica AmpA::GFP (cedida por el Dr. Stephen A. Osmani) reveló que, aunque como se había observado en *S. cerevisiae* para Rvs167p, AmpA se localizaba en parches corticales, estos parches eran menos abundantes que los de AbpA, y se apreció también una mayor acumulación de la fluorescencia en la punta de la hifa (Fig. A2.6A). Para poder comparar la localización de AmpA y AbpA se generó, mediante cruzamiento génico, una cepa que expresaba AmpA::GFP y AbpA::mRFP. Como se observa en el panel B de la figura A2.6 fue posible observar colocalización entre algunos parches de AmpA y de AbpA. La falta de colocalización para determinados parches podría ser debido al relativo menor tiempo de interacción entre AmpA y el parche de actina comparado con el de AbpA, como se ha demostrado para sus ortólogos en *S. cerevisiae* ²⁴⁷.

4. SlaB, un componente de los parches de actina, se localiza en un anillo subapical situado en la punta de la hifa.

Sla2p de *S. cerevisiae* es un componente de los parches endocíticos que desempeña un importante papel en la internalización endocítica, facilitando la interacción entre la actina y los elementos de la maquinaria endocítica ²⁷¹. Al contrario de lo que ocurre con Abp1p, la localización subcelular de Sla2p es independiente de F-actina, no viéndose alterada por el tratamiento con LatB ²⁷².

Utilizando la secuencia de Sla2p se realizaron búsquedas de similitud de secuencias (tBLASTn) encontrando sólo el gen AN2756 en *A. nidulans* que debe codificar para el posible ortólogo de Sla2p. AN2756 se localiza en el brazo derecho del cromosoma VI y ha sido denominado *slaB*. La comparación de las versiones genómica y cDNA reveló que la región codificante de este gen está dividida en 12 exones y codifica para una proteína de 1043 aminoácidos, que comparte un 56% de identidad y un 71% de similitud con su ortólogo Sla2p de *S. cerevisiae*. SlaB contiene en su región C-terminal un dominio I/L WEQ capaz de unir actina y un dominio ANTH en la región N-terminal que está presente en todos los ortólogos de Sla2p (Fig. A2.7A). Este tipo de dominios es capaz de unir PtdIns(4,5)P₂, muy abundantes en la membrana plasmática.

Para analizar la localización subcelular de SlaB se construyó una cepa que expresaba la proteína quimérica SlaB::GFP, mediante reemplazamiento génico de la región codificante de *slaB* por la construcción *slaB::gfp::pyrG^{Afum}*. Al analizar con el microscopio de epifluorescencia la cepa que expresaba la proteína SlaB::GFP se

observó que dicha proteína se localizaba en parches corticales bastante más abundantes que los observados en AbpA::GFP (Fig. A2.7B). Estos parches eran mucho más abundantes en la punta de la hifa lo que constituía otra prueba a favor de la hipótesis sobre la necesidad de que la endocitosis sea muy abundante en esta región. Al igual que lo observado con AbpA, SlaB es excluida del ápice de la hifa (Fig. A2.7B).

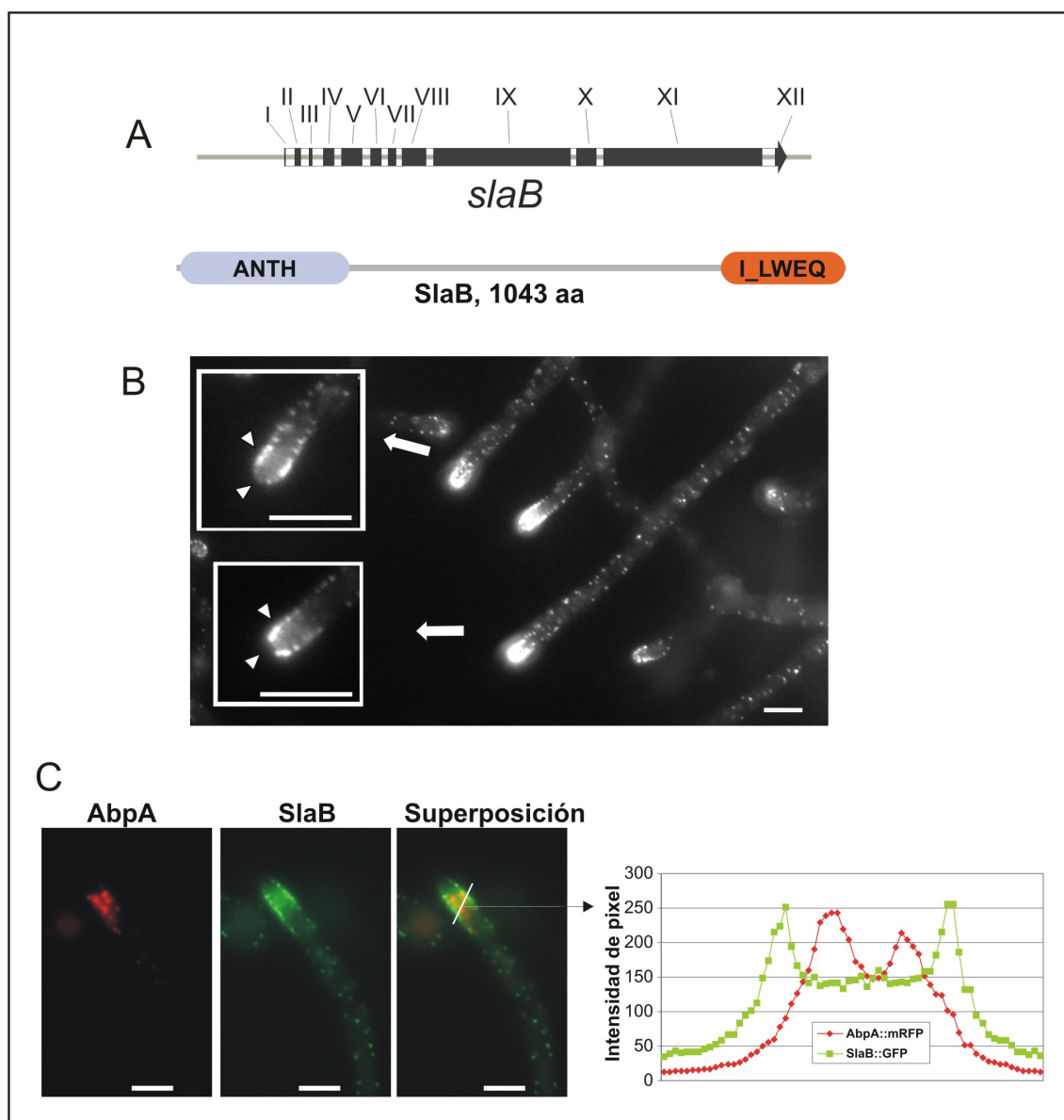


Figura A2.7: Caracterización de *slaB*, el ortólogo de *sla2* en *A. nidulans*. **A)** Representación esquemática de la región codificante de *slaB* donde los bloques en blanco representan la posición de los intrones y los números romanos los exones, y, en la parte inferior, representación de los dominios funcionales descritos en Sla2p que también están presentes en SlaB. El dominio ANTH está implicado en la interacción con los PtdIns(4,5)P₂ y el dominio I/LWEQ es capaz de unir actina. **B)** Localización subcelular de SlaB::GFP en parches corticales que son más abundantes en la punta de la hifa, sin llegar al ápice. **C)** Imágenes obtenidas de una cepa que expresaba conjuntamente AbpA::mRFP y SlaB::GFP. El gráfico indica la intensidad de fluorescencia emitida por ambas proteínas fluorescentes a lo largo de la línea dibujada en la imagen.

Para poder observar la localización conjunta de AbpA y SlaB se construyó, mediante cruzamiento génico, una cepa que expresaba las dos proteínas quiméricas, SlaB::GFP y AbpA::mRFP. Como se observa en el panel C de la figura A2.7 no existía colocalización entre los parches corticales observados para ambas proteínas. Las imágenes obtenidas mostraban que SlaB se localizaba más cerca de la membrana plasmática que AbpA (Fig. A2.7C, gráfico); por tanto, AbpA se localizaría en la cara interna del anillo cortical que formarían los parches de SlaB. Además, los resultados obtenidos con los tres marcadores de endocitosis, AbpA, AmpA y SlaB, situarían este anillo endocítico en la región subapical de la hifa, quedando libre el ápice donde se ha determinado que predominan los procesos de exocitosis²⁷³.

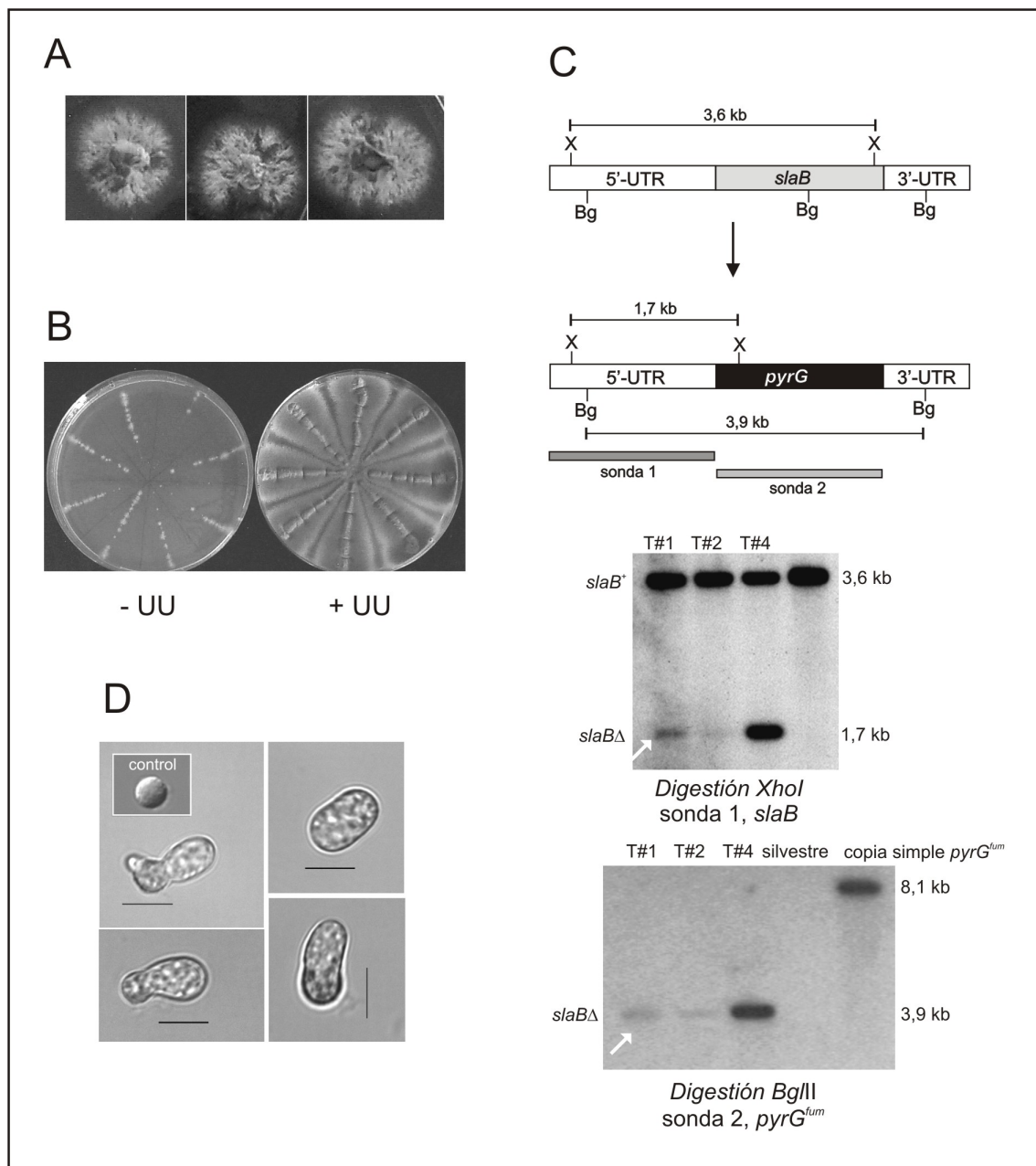


Figura A2.8: Análisis del alelo $\Delta slaB$. **A)** Fenotipo de las colonias heterocariontes obtenidas tras la transformación. **B)** Conidiosporas procedentes de estas colonias fueron incapaces de crecer en una placa de medio mínimo sin suplementar con pirimidinas (-UU) pero fueron capaces de formar colonias en una placa de medio mínimo suplementado con pirimidinas (+UU). **C)** Análisis mediante Southern del DNA de los transformantes. En el esquema se indican los tamaños de banda esperados con cada una de las enzimas utilizadas. X y Bg indican sitios de restricción para *Xho*I y *Bgl*II, respectivamente. Las flechas blancas señalan la banda correspondiente al alelo $\Delta slaB$ que fue detectado utilizando sondas específicas para *slaB* (sonda 1) y *pyrG*^{*Afum*} (sonda 2). Como control en el panel inferior se utilizó DNA de una cepa portadora de una copia simple de *pyrG*^{*Afum*}. **D)** Análisis microscópico del fenotipo terminal causado por el alelo $\Delta slaB$. Conidiosporas de una cepa $\Delta slaB/slaB$ y de una cepa control fueron incubadas durante 24h a 25°C en medio mínimo sin suplementar con pirimidinas. Se muestran cuatro ejemplos representativos de las germinulas de morfología anormal observadas. Barra = 5µm.

4.1 *slaB* es un gen esencial.

Los resultados obtenidos sugerían que los procesos de endocitosis deben jugar un papel muy importante en el crecimiento polar de la hifa. De ser cierto, los genes claves de la internalización endocítica deberían ser esenciales, al menos para el crecimiento vegetativo. De acuerdo con esta hipótesis el gen *slaB* resultó ser esencial para *A. nidulans*.

El alelo nulo de *slaB* se generó reemplazando la región codificante del gen *slaB* por el gen *pyrG* de *A. fumigatus*. Para ello se construyó mediante PCR un fragmento formado por el gen *pyrG* de *A. fumigatus* flanqueado por las regiones 5' y 3' no traducidas (5' y 3'UTR) del gen *slaB*. Esta construcción se transformó en la cepa MAD1425 portadora de la mutación *pyrG*89. Los transformantes obtenidos mostraron un claro aspecto heterocariótico, con colonias carentes de un crecimiento radial uniforme, mostrando sectores de aspecto arborescente y con escasa esporulación (Fig. A2.8A). Conidiosporas procedentes de estos transformantes fueron capaces de formar colonias en medio mínimo suplementado con pirimidinas pero su crecimiento fue extremadamente reducido en medio carente de pirimidinas (Fig. A2.8B) lo que indicaba que el alelo $\Delta slaB$ resultaba letal para *A. nidulans*. La heterocariosis fue confirmada mediante Southern-blot (Fig. A2.8C) utilizando una sonda de DNA que hibridaba con la región 5'UTR de *slaB* y otra que permitía detectar el gen *pyrG*. El resultado obtenido puso de manifiesto la falta de balance existente entre los dos alelos presentes en el heterocariote, siendo mucho menos abundante el alelo $\Delta slaB$ que el alelo *slaB*⁺, según se aprecia por la diferencia de detección de la banda correspondiente al alelo $\Delta slaB$ de 1,7kb frente a la banda del alelo *slaB*⁺ de 3,6kb (Fig. A2.8C). En el caso del transformante 4 (T#4) la igualdad en la intensidad de las bandas, junto con la

morfología de la colonia observada, sugería que se había formado un diploide, hecho que reforzaba la clasificación como gen esencial de *slaB*.

Para caracterizar el fenotipo terminal del alelo *ΔslaB* se realizó un análisis microscópico de la germinación de los conidios procedentes del heterocarionte. Tras 24h de incubación a 25°C en medio mínimo sin suplementar con pirimidinas no se detectó la presencia de tubo germinativo en ninguno de los conidios procedentes de una cepa silvestre auxótrofa para pirimidinas (n=1514) (Fig. A2.8D, control). Por el contrario, en el heterocarionte el 3% de los conidios (n=1616) habían sido capaces de emitir un pequeño y grueso tubo germinativo (Fig. A2.8D). La presencia de esta reducida clase de conidios fue confirmada tras 24h de incubación en medio con pirimidinas, donde la mayor parte de los conidios, portadores del alelo silvestre, fueron capaces de desarrollar una hifa y sólo unos pocos presentaban la morfología mencionada anteriormente. Estos resultados indicaban que en ausencia de la proteína SlaB los conidios son capaces de establecer la polaridad pero no de desarrollar un tubo germinativo normal, demostrando que la localización de la maquinaria endocítica en la región subapical es esencial para que las células del hongo mantengan un crecimiento polarizado. A partir de la observación de la localización de los diferentes componentes analizados de la ruta de endocitosis se podría proponer la existencia de una compleja estructura en forma de anillo en la región subapical de la célula fúngica en donde se concentran los procesos de endocitosis que, asociados a los de exocitosis en el ápice, dan lugar al crecimiento hifal.

DISCUSIÓN.

El crecimiento apical de las hifas de *A. nidulans* es de 0,5 micras/segundos²⁵¹ lo que se traduce en una gran demanda de material biosintético que ha de llegar a la punta de la hifa en el interior de vesículas o formando parte de la membrana de éstas²⁵³. Para generar el crecimiento hifal es necesario que la velocidad de aportación de material no exceda la velocidad del ensamblaje de los componentes de la pared celular entorno al punto de secreción de las anteriores vesículas exocíticas. El exceso de membrana resultante, así como de las proteínas implicadas en la fusión de las vesículas, debe ser eliminado de la membrana plasmática apical lo que sugiere la existencia de procesos de endocitosis que, como ocurre en células secretoras de mamíferos²⁷⁴, compensen el exceso de exocitosis puesto que de lo contrario se produciría un crecimiento globular o isotrópico.

Una importante evidencia del papel que juega la endocitosis en el crecimiento polarizado se ha obtenido de trabajos realizados en el hongo *Ustilago maydis*. Este hongo tiene un prominente compartimento endosomal muy cerca del ápice de la hifa. La alteración del tráfico de membranas a través de este compartimento provoca la formación de una gruesa hifa de forma irregular e impide el reciclaje de proteínas localizadas en el ápice ^{257,260,275}. La extraña morfología de estas hifas se debe a un defecto en el mantenimiento de la polaridad. Otra evidencia a favor de la polarización de los procesos de endocitosis implicados en el reciclaje de membranas de la punta, en hongos con crecimiento polarizado, es la tinción del Spitzenkörper con el marcador de membranas FM4-64 ²⁵⁸. Finalmente, de acuerdo con el importante papel de la endocitosis en el crecimiento polar de *A. nidulans*, los mutantes en el gen *swoC* (alelo *swoCI*) afectados en el establecimiento de la polaridad muestran un importante defecto en la internalización de FM4-64 ²⁷⁶ y un mutante constitutivo en la miosina tipo I de *A. nidulans*, *myoA*, presenta una marcada acumulación de vesículas endocíticas cerca de la punta de la hifa ²⁷⁷.

Los datos anteriores sugieren que los procesos de endocitosis implicados en el reciclaje de membranas predominan en la punta de la hifa; por tanto, sería esperable que la maquinaria de endocitosis estuviera también fuertemente polarizada. Los resultados obtenidos utilizando versiones fluorescentes de AbpA, AmpA y SlaB demuestran que esta hipótesis es cierta. Se ha observado que los parches de actina endocíticos están presentes en una mayor concentración en la punta de la hifa, lo que sugiere que la endocitosis es particularmente activa en esta región. La polarización de la maquinaria de endocitosis es visible tan pronto como las germínulas pasan su fase de crecimiento isotrópico y se establece el crecimiento polar. Por lo tanto, los resultados obtenidos constituyen una evidencia a favor del modelo propuesto por Steinberg según el cual los procesos de reciclaje endocítico juegan un importante papel en el crecimiento hifal polarizado ^{256,257}. El hecho de que la proteína SlaB sea esencial señala la importancia de la endocitosis en el crecimiento de los hongos filamentosos; sin embargo, la ausencia de SlaB no impide establecer la polaridad aunque sí su mantenimiento.

Los parches de actina se sitúan en la región subapical de la hifa. La región apical carece de la maquinaria endocítica y corresponde a la zona donde se sitúa el Spitzenkörper y la maquinaria de exocitosis. Por tanto, en las primeras 3-4 μm de la punta de la hifa parece existir un acoplamiento espacial entre los procesos de endocitosis, situados en la región subapical, y los procesos secretorios altamente activos

en el ápice de la hifa. Una importante cuestión a resolver es qué determina la organización de la maquinaria endocítica en un anillo subapical. Una posibilidad sería la existencia de diferencias en la composición lipídica de la membrana plasmática entre la región apical, donde se produce la secreción, y la región subapical, donde predomina la endocitosis. Un ejemplo de ello es la polarización de dominios ricos en esteroides en la punta de *A. nidulans*²⁷⁸ que depende de la proteína subapical MesA, también necesaria para la localización apical de la formina SepA²⁷⁸. La existencia de procesos de endocitosis asociados al reciclaje de membranas puede ayudar a mantener la diferente composición lipídica y proteica de la membrana plasmática²⁵⁹ lo que podría contribuir al mantenimiento del crecimiento hifal.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

1.- Se ha caracterizado el sistema general de exportación nuclear en *A. nidulans*, la ruta mediada por KapK, el homólogo de la Exportina-1. Este sistema es esencial para *Aspergillus* como demuestra la letalidad causada por el alelo nulo de *kapK*.

2.- Mediante genética en reverso se han desarrollado cepas sensibles a la leptomicina B que pueden ser utilizadas para estudiar el sistema de exportación nuclear dependiente de KapK y así determinar posibles cargas y sistemas reguladores de la expresión génica dependientes de esta ruta de transporte nuclear.

3.- El factor de transcripción que activa la ruta de asimilación del nitrato, NirA, es exportado del núcleo por KapK. En NirA la actividad de la NES está regulada por la fuente de nitrógeno mientras que su importación al núcleo parece ser constitutiva.

4.- El estudio de interactores de NirA ha permitido identificar a un elemento del NPC, la nucleoporina NplA. NplA podría mediar la exportación nuclear de NirA a través de la interacción con KapK. Existen múltiples puntos de contacto entre NplA y KapK. Adicionalmente se ha recogido evidencia de que NplA debe ser procesada.

5.- Se han identificado los homólogos del heterodímero Importina α /Importina β 1, KapA y KapB, respectivamente. Este heterocomplejo media la ruta general de importación nuclear, la cual es también esencial para el hongo.

6.- KapA es capaz de reconocer tanto NLSs monopartitas como bipartitas. De la primera clase se ha identificado una NLS en la *nucleosome assembly protein* NapB, y de la segunda clase en VeA, el regulador transcripcional que media el desarrollo sexual y asexual en respuesta a la luz.

7. KapK, KapA y KapB se encuentran mayoritariamente asociadas al núcleo. Mientras que KapK y KapA predominan en el interior del núcleo, KapB presenta una localización perinuclear. Tanto KapK como KapB parecen estar asociadas, al menos en determinados puntos, con elementos del poro nuclear. NplA se requiere para una correcta localización del exportador KapK.

8.- Los citoesqueletos de actina y tubulina podrían desempeñar un importante papel en los procesos de transporte nuclear. La Importina α y la Importina β 1 se desplazan por la célula utilizando ambos citoesqueletos. El complejo motor dineína/dinactina citoplásmico parece estar implicado en el desplazamiento de KapA por el citoplasma.

9.- Mediante el estudio del citoesqueleto de actina y la caracterización de tres proteínas que participan en el proceso de invaginación de la membrana plasmática: AbpA, AmpA y SlaB, se ha determinado que el proceso de endocitosis ocurre a lo largo de la célula fúngica y predomina en la proximidad del ápice.

10.- La maquinaria endocítica se sitúa formando una estructura anular en la región subapical de la célula y precede al punto donde se concentra el proceso de exocitosis en *A. nidulans*, el ápice de la hifa.

11.- El análisis del alelo nulo de *slaB* ha puesto de manifiesto la necesidad de la polarización de los procesos de endocitosis, de forma concertada con el proceso de exocitosis, para el mantenimiento del crecimiento polar de la célula.

12.-En relación con la organización del citoesqueleto de actina, se ha caracterizado el gen *pprA*, que codifica para una proteína con repeticiones pentatricopeptídicas. PprA es esencial y mediante el estudio genético, molecular y celular del mutante condicional *pprA1* se ha determinado su papel en la organización del citoesqueleto de actina, la morfología de las mitocondrias y la distribución nuclear, aunque los procesos de transporte nuclear no están alterados.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M., Macdonald, K.D. & Bufton, A.W.J. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.* **5**, 141-238 (1953).
2. Thom, C. & Raper, K.B. A manual of the *Aspergilli*. Bailliére Tindall y Cox (eds). London., (1945).
3. Casselton, L. & Zolan, M. The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 683-697 (2002).
4. Penalva, M.A. A fungal perspective on human inborn errors of metabolism: alkaptonuria and beyond. *Fungal. Genet. Biol.* **34**, 1-10 (2001).
5. Galagan, J.E. *et al.* Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* **438**, 1105-1115 (2005).
6. Gorlich, D. & Kutay, U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**, 607-660 (1999).
7. Ohtsubo, M., Okazaki, H. & Nishimoto, T. The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J. Cell Biol.* **109**, 1389-1397 (1989).
8. Macara, I.G. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 570-94, table (2001).
9. Bischoff, F.R. & Ponstingl, H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**, 80-82 (1991).
10. Bischoff, F.R. & Ponstingl, H. Catalysis of guanine nucleotide exchange of Ran by RCC1 and stimulation of hydrolysis of Ran-bound GTP by Ran-GAP1. *Methods Enzymol.* **257**, 135-144 (1995).
11. Bischoff, F.R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W. & Ponstingl, H. Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J.* **14**, 705-715 (1995).
12. Pemberton, L.F. & Paschal, B.M. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic.* **6**, 187-198 (2005).
13. Makkerh, J.P., Dingwall, C. & Laskey, R.A. Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr. Biol.* **6**, 1025-1027 (1996).
14. Mattaj, I.W. & Englmeier, L. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 265-306 (1998).
15. Malik, H.S., Eickbush, T.H. & Goldfarb, D.S. Evolutionary specialization of the nuclear targeting apparatus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 13738-13742 (1997).

16. Mosammaparast,N. & Pemberton,L.F. Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol.* **14**, 547-556 (2004).
17. Strom,A.C. & Weis,K. Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol.* **2**, REVIEWS3008 (2001).
18. Chook,Y.M. & Blobel,G. Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 703-715 (2001).
19. Madrid,A.S. & Weis,K. Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma* **115**, 98-109 (2006).
20. Chook,Y.M. & Blobel,G. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature* **399**, 230-237 (1999).
21. Scheffzek,K., Klebe,C., Fritz-Wolf,K., Kabsch,W. & Wittinghofer,A. Crystal structure of the nuclear Ras-related protein Ran in its GDP-bound form. *Nature* **374**, 378-381 (1995).
22. Petosa,C. *et al.* Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol. Cell* **16**, 761-775 (2004).
23. Kutay,U. *et al.* Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol. Cell* **1**, 359-369 (1998).
24. Simos,G., Grosshans,H. & Hurt,E. Nuclear export of tRNA. *Results Probl. Cell Differ.* **35**, 115-131 (2002).
25. Arts,G.J., Kuersten,S., Romby,P., Ehresmann,B. & Mattaj,I.W. The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J.* **17**, 7430-7441 (1998).
26. Lund,E. & Dahlberg,J.E. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* **282**, 2082-2085 (1998).
27. Calado,A., Treichel,N., Muller,E.C., Otto,A. & Kutay,U. Exportin-5-mediated nuclear export of eukaryotic elongation factor 1A and tRNA. *EMBO J.* **21**, 6216-6224 (2002).
28. Weis,K. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112**, 441-451 (2003).
29. Kaffman,A., Rank,N.M., O'Neill,E.M., Huang,L.S. & O'Shea,E.K. The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* **396**, 482-486 (1998).
30. DeVit,M.J. & Johnston,M. The nuclear exportin Msn5 is required for nuclear export of the Mig1 glucose repressor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* **9**, 1231-1241 (1999).

31. Lenburg, M.E. & O'Shea, E.K. Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 383-387 (1996).
32. Yoshida, K. & Blobel, G. The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J. Cell Biol.* **152**, 729-740 (2001).
33. Mingot, J.M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. & Gorlich, D. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* **20**, 3685-3694 (2001).
34. Cronshaw, J.M., Krutchinsky, A.N., Zhang, W., Chait, B.T. & Matunis, M.J. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **158**, 915-927 (2002).
35. Rout, M.P. *et al.* The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* **148**, 635-651 (2000).
36. Blobel, G. & Wozniak, R.W. Proteomics for the pore. *Nature* **403**, 835-836 (2000).
37. Ryan, K.J. & Wentse, S.R. The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 361-371 (2000).
38. Suntharalingam, M. & Wentse, S.R. Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. *Dev. Cell* **4**, 775-789 (2003).
39. Allen, T.D., Cronshaw, J.M., Bagley, S., Kiseleva, E. & Goldberg, M.W. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 10), 1651-1659 (2000).
40. Rout, M.P. & Aitchison, J.D. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* **276**, 16593-16596 (2001).
41. Bayliss, R., Littlewood, T. & Stewart, M. Structural basis for the interaction between FxFG nucleoporin repeats and importin-beta in nuclear trafficking. *Cell* **102**, 99-108 (2000).
42. Bayliss, R. *et al.* Structural basis for the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats. *EMBO J.* **21**, 2843-2853 (2002).
43. Bayliss, R., Littlewood, T., Strawn, L.A., Wentse, S.R. & Stewart, M. GLFG and FxFG nucleoporins bind to overlapping sites on importin-beta. *J. Biol. Chem.* **277**, 50597-50606 (2002).
44. Fribourg, S., Braun, I.C., Izaurralde, E. & Conti, E. Structural basis for the recognition of a nucleoporin FG repeat by the NTF2-like domain of the TAP/p15 mRNA nuclear export factor. *Mol. Cell* **8**, 645-656 (2001).
45. Ben Efraim, I. & Gerace, L. Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import. *J. Cell Biol.* **152**, 411-417 (2001).
46. Ribbeck, K. & Gorlich, D. The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J.* **21**, 2664-2671 (2002).

47. Ovechkina, Y. *et al.* Spindle formation in *Aspergillus* is coupled to tubulin movement into the nucleus. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2192-2200 (2003).
48. Li, J., Meyer, A.N. & Donoghue, D.J. Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 502-507 (1997).
49. Rose, A., Patel, S. & Meier, I. The plant nuclear envelope. *Planta* **218**, 327-336 (2004).
50. Burke, B. & Ellenberg, J. Remodelling the walls of the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 487-497 (2002).
51. Straube, A., Weber, I. & Steinberg, G. A novel mechanism of nuclear envelope break-down in a fungus: nuclear migration strips off the envelope. *EMBO J.* **24**, 1674-1685 (2005).
52. Rabut, G., Lenart, P. & Ellenberg, J. Dynamics of nuclear pore complex organization through the cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 314-321 (2004).
53. Makhnevych, T., Lusk, C.P., Anderson, A.M., Aitchison, J.D. & Wozniak, R.W. Cell cycle regulated transport controlled by alterations in the nuclear pore complex. *Cell* **115**, 813-823 (2003).
54. De Souza, C.P., Osmani, A.H., Hashmi, S.B. & Osmani, S.A. Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* **14**, 1973-1984 (2004).
55. Lenart, P. *et al.* Nuclear envelope breakdown in starfish oocytes proceeds by partial NPC disassembly followed by a rapidly spreading fenestration of nuclear membranes. *J. Cell Biol.* **160**, 1055-1068 (2003).
56. Cove, D.J. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* **113**, 51-56 (1966).
57. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press., (1989).
58. Mooney, J.L. & Yager, L.N. Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev.* **4**, 1473-1482 (1990).
59. Clutterbuck, A.J. *Genetic Maps. Locus maps of complex genomes*. O'Brien, S. (ed.) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990).
60. Yano, R., Oakes, M.L., Tabb, M.M. & Nomura, M. Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/beta-catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 6880-6884 (1994).
61. Bachman, B.J. Genetic maps. O'Brien, S.J. (ed.), pp. 145-161 (Cold Spring Harbor; New York, 1984).

62. Fernandez-Martinez,J. *et al.* Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J. Mol. Biol.* **334**, 667-684 (2003).
63. Orejas,M. *et al.* Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**, 1622-1632 (1995).
64. Lockington,R.A., Sealy-Lewis,H.M., Scazzocchio,C. & Davies,R.W. Cloning and characterization of the ethanol utilization regulon in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **33**, 137-149 (1985).
65. Sikorski,R.S. & Hieter,P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27 (1989).
66. Fernandez-Martinez,J. Mecanismos y señales que regulan el transporte nuclear del factor de transcripción PacC en *Aspergillus nidulans*. 23-1-2007. Universidad Complutense de Madrid. 23-1-2007.
Ref Type: Thesis/Dissertation
67. Yang,L. *et al.* Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **3**, 1359-1362 (2004).
68. Tilburn,J. *et al.* Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**, 205-221 (1983).
69. Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
70. Yang,X., Hubbard,E.J. & Carlson,M. A protein kinase substrate identified by the two-hybrid system. *Science* **257**, 680-682 (1992).
71. Laemmli,U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
72. Shevchenko,A., Wilm,M., Vorm,O. & Mann,M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858 (1996).
73. Penalva,M.A. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal. Genet. Biol.* **42**, 963-975 (2005).
74. Prigozhina,N.L., Walker,R.A., Oakley,C.E. & Oakley,B.R. Gamma-tubulin and the C-terminal motor domain kinesin-like protein, KLPA, function in the establishment of spindle bipolarity in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3161-3174 (2001).
75. Schmidt-Zachmann,M.S., Dargemont,C., Kuhn,L.C. & Nigg,E.A. Nuclear export of proteins: the role of nuclear retention. *Cell* **74**, 493-504 (1993).

76. Adachi,Y. & Yanagida,M. Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J. Cell Biol.* **108**, 1195-1207 (1989).
77. Stade,K., Ford,C.S., Guthrie,C. & Weis,K. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**, 1041-1050 (1997).
78. Hutten,S. & Kehlenbach,R.H. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends Cell Biol.* **17**, 193-201 (2007).
79. Fornerod,M. *et al.* The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J.* **16**, 807-816 (1997).
80. Andrade,M.A., Petosa,C., O'Donoghue,S.I., Muller,C.W. & Bork,P. Comparison of ARM and HEAT protein repeats. *J. Mol. Biol.* **309**, 1-18 (2001).
81. Ossareh-Nazari,B. & Dargemont,C. Domains of Crm1 involved in the formation of the Crm1, RanGTP, and leucine-rich nuclear export sequences trimeric complex. *Exp. Cell Res.* **252**, 236-241 (1999).
82. Wen,W., Meinkoth,J.L., Tsien,R.Y. & Taylor,S.S. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* **82**, 463-473 (1995).
83. Benzeno,S. *et al.* Identification of mutations that disrupt phosphorylation-dependent nuclear export of cyclin D1. *Oncogene* **25**, 6291-6303 (2006).
84. Sasaki,T. *et al.* Spatiotemporal regulation of c-Fos by ERK5 and the E3 ubiquitin ligase UBR1, and its biological role. *Mol. Cell* **24**, 63-75 (2006).
85. Englmeier,L. *et al.* RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBO Rep.* **2**, 926-932 (2001).
86. Lindsay,M.E., Holaska,J.M., Welch,K., Paschal,B.M. & Macara,I.G. Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J. Cell Biol.* **153**, 1391-1402 (2001).
87. Ossareh-Nazari,B., Gwizdek,C. & Dargemont,C. Protein export from the nucleus. *Traffic.* **2**, 684-689 (2001).
88. Queralt,E. & Igual,J.C. Cell Cycle Activation of the Swi6p Transcription Factor Is Linked to Nucleocytoplasmic Shuttling. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 3126-3140 (2003).
89. Kudo,N. *et al.* Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 9112-9117 (1999).
90. Ossareh-Nazari,B., Bachelierie,F. & Dargemont,C. Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* **278**, 141-144 (1997).

91. Burger,G., Strauss,J., Scazzocchio,C. & Lang,B.F. nirA, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol Cell Biol.* **11**, 5746-5755 (1991).
92. Cove,D.J. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **54**, 291-327 (1979).
93. Scazzocchio,C. & Arst,H.N., Jr. Molecular and genetic aspects of nitrate assimilation. Wray,J.L. & Kinghorn,J.R. (eds.), pp. 299-313 (Oxford Science Publications, Oxford,1989).
94. Berger,H. *et al.* The GATA factor AreA regulates localization and in vivo binding site occupancy of the nitrate activator NirA. *Mol. Microbiol.* **59**, 433-446 (2006).
95. Heath,I.B. Variant mitosis in lower eukaryotes: Indicators of evolution of mitosis? *Int.Rev.Cytol.* **64**, 1-80. 1980.
96. Farjot,G., Sergeant,A. & Mikaelian,I. A New Nucleoporin-like Protein Interacts with Both HIV-1 Rev Nuclear Export Signal and CRM-1. *J. Biol. Chem.* **274**, 17309-17317 (1999).
97. Bogerd,H.P., Fridell,R.A., Madore,S. & Cullen,B.R. Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* **82**, 485-494 (1995).
98. Fritz,C.C., Zapp,M.L. & Green,M.R. A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature* **376**, 530-533 (1995).
99. Floer,M. & Blobel,G. Putative Reaction Intermediates in Crm1-mediated Nuclear Protein Export. *J. Biol. Chem.* **274**, 16279-16286 (1999).
100. Osmani,A.H., Davies,J., Liu,H.L., Nile,A. & Osmani,S.A. Systematic deletion and mitotic localization of the nuclear pore complex proteins of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4946-4961 (2006).
101. Blondel,M. *et al.* Nuclear export of Far1p in response to pheromones requires the export receptor Msn5p/Ste21p. *Genes Dev.* **13**, 2284-2300 (1999).
102. Huh,W.K. *et al.* Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**, 686-691 (2003).
103. Bernad,R., van,d., V, Fornerod,M. & Pickersgill,H. Nup358/RanBP2 attaches to the nuclear pore complex via association with Nup88 and Nup214/CAN and plays a supporting role in CRM1-mediated nuclear protein export. *Mol. Cell Biol.* **24**, 2373-2384 (2004).
104. Hutten,S. & Kehlenbach,R.H. Nup214 is required for CRM1-dependent nuclear protein export in vivo. *Mol. Cell Biol.* **26**, 6772-6785 (2006).

105. Eduardo A.Espeso & Stephen Osmani. The Aspergilli. Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods. Gustavo H.Goldman & Stephen Osmani (eds.), pp. 261-277 (CRC Press. Taylor and Francis Group,2008).
106. Joseph,J., Tan,S.H., Karpova,T.S., McNally,J.G. & Dasso,M. SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J. Cell Biol.* **156**, 595-602 (2002).
107. Joseph,J., Liu,S.T., Jablonski,S.A., Yen,T.J. & Dasso,M. The RanGAP1-RanBP2 complex is essential for microtubule-kinetochore interactions in vivo. *Curr. Biol.* **14**, 611-617 (2004).
108. Salina,D., Enarson,P., Rattner,J.B. & Burke,B. Nup358 integrates nuclear envelope breakdown with kinetochore assembly. *J. Cell Biol.* **162**, 991-1001 (2003).
109. Wang,W., Budhu,A., Forgues,M. & Wang,X.W. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat. Cell Biol.* **7**, 823-830 (2005).
110. la Cour,T. *et al.* NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. *Nucleic Acids Res.* **31**, 393-396 (2003).
111. Dominguez,D. *et al.* Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5078-5089 (2003).
112. Ishida,N. *et al.* Phosphorylation of p27Kip1 on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J. Biol. Chem.* **277**, 14355-14358 (2002).
113. Okamura,H. *et al.* Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell* **6**, 539-550 (2000).
114. Yagita,K. *et al.* Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells. *Genes Dev.* **14**, 1353-1363 (2000).
115. Zhang,Y. & Xiong,Y. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* **292**, 1910-1915 (2001).
116. Delaunay,A., Isnard,A.D. & Toledano,M.B. H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* **19**, 5157-5166 (2000).
117. Wood,M.J., Storz,G. & Tjandra,N. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* **430**, 917-921 (2004).
118. Bailer,S.M. *et al.* Nup116p and nup100p are interchangeable through a conserved motif which constitutes a docking site for the mRNA transport factor gle2p. *EMBO J.* **17**, 1107-1119 (1998).
119. Hodge,C.A., Colot,H.V., Stafford,P. & Cole,C.N. Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *EMBO J.* **18**, 5778-5788 (1999).

120. Pritchard,C.E., Fornerod,M., Kasper,L.H. & van Deursen,J.M. RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J. Cell Biol.* **145**, 237-254 (1999).
121. Pyhtila,B. & Rexach,M. A gradient of affinity for the karyopherin Kap95p along the yeast nuclear pore complex. *J. Biol. Chem.* **278**, 42699-42709 (2003).
122. Schmitt,C. *et al.* Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. *EMBO J.* **18**, 4332-4347 (1999).
123. Shah,S. & Forbes,D.J. Separate nuclear import pathways converge on the nucleoporin Nup153 and can be dissected with dominant-negative inhibitors. *Curr. Biol.* **8**, 1376-1386 (1998).
124. Gorlich,D. & Mattaj,I.W. Nucleocytoplasmic transport. *Science* **271**, 1513-1518 (1996).
125. Nehrbass,U. & Blobel,G. Role of the nuclear transport factor p10 in nuclear import. *Science* **272**, 120-122 (1996).
126. Rexach,M. & Blobel,G. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell* **83**, 683-692 (1995).
127. Carballo,E., Lai,W.S. & Blackshear,P.J. Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- α production by tristetraprolin. *Science* **281**, 1001-1005 (1998).
128. Lai,W.S. *et al.* Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor α mRNA. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4311-4323 (1999).
129. Kendirgi,F., Rexer,D.J., Alcazar-Roman,A.R., Onishko,H.M. & Wente,S.R. Interaction between the shuttling mRNA export factor Gle1 and the nucleoporin hCG1: a conserved mechanism in the export of Hsp70 mRNA. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4304-4315 (2005).
130. Rosenblum,J.S. & Blobel,G. Autoproteolysis in nucleoporin biogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 11370-11375 (1999).
131. De Souza,C.P., Horn,K.P., Masker,K. & Osmani,S.A. The SONB(NUP98) nucleoporin interacts with the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **165**, 1071-1081 (2003).
132. Fontoura,B.M., Blobel,G. & Matunis,M.J. A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. *J. Cell Biol.* **144**, 1097-1112 (1999).
133. Teixeira,M.T. *et al.* Two functionally distinct domains generated by in vivo cleavage of Nup145p: a novel biogenesis pathway for nucleoporins. *EMBO J.* **16**, 5086-5097 (1997).

134. Todd,R.B., Fraser,J.A., Wong,K.H., Davis,M.A. & Hynes,M.J. Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryot. Cell* **4**, 1646-1653 (2005).
135. Kalderon,D., Roberts,B.L., Richardson,W.D. & Smith,A.E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* **39**, 499-509 (1984).
136. Robbins,J., Dilworth,S.M., Laskey,R.A. & Dingwall,C. Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**, 615-623 (1991).
137. Fontes,M.R., Teh,T., Jans,D., Brinkworth,R.I. & Kobe,B. Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . *J. Biol. Chem.* **278**, 27981-27987 (2003).
138. Pokorska,A., Drevet,C. & Scazzocchio,C. The analysis of the transcriptional activator PrnA reveals a tripartite nuclear localisation sequence. *J. Mol. Biol.* **298**, 585-596 (2000).
139. Pollard,V.W. *et al.* A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**, 985-994 (1996).
140. Rosenblum,J.S., Pemberton,L.F., Bonifaci,N. & Blobel,G. Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein. *J. Cell Biol.* **143**, 887-899 (1998).
141. Huber,J. *et al.* Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J.* **17**, 4114-4126 (1998).
142. Gorlich,D., Vogel,F., Mills,A.D., Hartmann,E. & Laskey,R.A. Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* **377**, 246-248 (1995).
143. Andrade,M.A. & Bork,P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat. Genet.* **11**, 115-116 (1995).
144. Cingolani,G., Petosa,C., Weis,K. & Muller,C.W. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* **399**, 221-229 (1999).
145. Goldfarb,D.S., Corbett,A.H., Mason,D.A., Harreman,M.T. & Adam,S.A. Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends in Cell Biology* **14**, 505-514 (2004).
146. Peifer,M., Berg,S. & Reynolds,A.B. A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell* **76**, 789-791 (1994).
147. Conti,E., Uy,M., Leighton,L., Blobel,G. & Kuriyan,J. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin α . *Cell* **94**, 193-204 (1998).

148. Fontes,M.R., Teh,T. & Kobe,B. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J. Mol. Biol.* **297**, 1183-1194 (2000).
149. Matsuura,Y., Lange,A., Harreman,M.T., Corbett,A.H. & Stewart,M. Structural basis for Nup2p function in cargo release and karyopherin recycling in nuclear import. *EMBO J.* **22**, 5358-5369 (2003).
150. Gorlich,D., Henklein,P., Laskey,R.A. & Hartmann,E. A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin-beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J.* **15**, 1810-1817 (1996).
151. Weis,K., Ryder,U. & Lamond,A.I. The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *EMBO J.* **15**, 1818-1825 (1996).
152. Herold,A., Truant,R., Wiegand,H. & Cullen,B.R. Determination of the Functional Domain Organization of the Importin alpha áNuclear Import Factor. *J. Cell Biol.* **143**, 309-318 (1998).
153. Fiddy,C. & Trinci,A.P. Mitosis, septation, branching and the duplication cycle in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* **97**, 169-184 (1976).
154. Loeb,J.D. *et al.* The yeast nuclear import receptor is required for mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**, 7647-7651 (1995).
155. Mingot,J.M., Espeso,E.A., Diez,E. & Penalva,M.A. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **21**, 1688-1699 (2001).
156. Jung,M.K., May,G.S. & Oakley,B.R. Mitosis in wild-type and beta-tubulin mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* **24**, 146-160 (1998).
157. Campbell,E.M. & Hope,T.J. Role of the cytoskeleton in nuclear import. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 761-771 (2003).
158. Hanz,S. & Fainzilber,M. Integration of retrograde axonal and nuclear transport mechanisms in neurons: implications for therapeutics. *Neuroscientist.* **10**, 404-408 (2004).
159. Smith,H.M. & Raikhel,N.V. Nuclear localization signal receptor importin alpha associates with the cytoskeleton. *Plant Cell* **10**, 1791-1799 (1998).
160. Konzack,S., Rischitor,P.E., Enke,C. & Fischer,R. The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **16**, 497-506 (2005).
161. Sampson,K. & Heath,I.B. The dynamic behaviour of microtubules and their contributions to hyphal tip growth in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **151**, 1543-1555 (2005).

162. Fischer,R., Zekert,N. & Takeshita,N. Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol. Microbiol.* **68**, 813-826 (2008).
163. Xiang,X., Han,G., Winkelmann,D.A., Zuo,W. & Morris,N.R. Dynamics of cytoplasmic dynein in living cells and the effect of a mutation in the dynactin complex actin-related protein Arp1. *Curr. Biol.* **10**, 603-606 (2000).
164. Yamamoto,A. & Hiraoka,Y. Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration. *J. Cell Sci.* **116**, 4501-4512 (2003).
165. Pratt,W.B., Galigniana,M.D., Harrell,J.M. & DeFranco,D.B. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell Signal.* **16**, 857-872 (2004).
166. Bonangelino,C.J., Chavez,E.M. & Bonifacino,J.S. Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2486-2501 (2002).
167. Selth,L. & Svejstrup,J.Q. Vps75, a new yeast member of the NAP histone chaperone family. *J. Biol. Chem.* **282**, 12358-12362 (2007).
168. Kellogg,D.R., Kikuchi,A., Fujii-Nakata,T., Turck,C.W. & Murray,A.W. Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins. *J. Cell Biol.* **130**, 661-673 (1995).
169. Park,Y.J. & Luger,K. Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem. Cell Biol.* **84**, 549-558 (2006).
170. Miyaji-Yamaguchi,M. *et al.* Involvement of nucleocytoplasmic shuttling of yeast Nap1 in mitotic progression. *Mol. Cell Biol.* **23**, 6672-6684 (2003).
171. Mosammaparast,N., Ewart,C.S. & Pemberton,L.F. A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J.* **21**, 6527-6538 (2002).
172. Mosammaparast,N., Del Rosario,B.C. & Pemberton,L.F. Modulation of histone deposition by the karyopherin kap114. *Mol. Cell Biol.* **25**, 1764-1778 (2005).
173. Park,Y.J. & Luger,K. The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 1248-1253 (2006).
174. Kellogg,D.R. & Murray,A.W. NAP1 acts with Clb1 to perform mitotic functions and to suppress polar bud growth in budding yeast. *J. Cell Biol.* **130**, 675-685 (1995).
175. O'Connell,M.J., Osmani,A.H., Morris,N.R. & Osmani,S.A. An extra copy of nimEcyclinB elevates pre-MPF levels and partially suppresses mutation of nimTcdc25 in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **11**, 2139-2149 (1992).

176. Stinnett,S.M., Espeso,E.A., Cobeno,L., Araujo-Bazan,L. & Calvo,A.M. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol. Microbiol.* **63**, 242-255 (2007).
177. Yager,L.N. Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology* **23**, 19-41 (1992).
178. Bayram,O. *et al.* VelB/VeA/LaeA complex coordinates light signal with fungal development and secondary metabolism. *Science* **320**, 1504-1506 (2008).
179. Fischer,R. Developmental biology. Sex and poison in the dark. *Science* **320**, 1430-1431 (2008).
180. Kim,H. *et al.* The veA gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal. Genet. Biol.* **37**, 72-80 (2002).
181. Kafer,E. Origins of translocations in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **52**, 217-232 (1965).
182. Tabb,M.M., Tongaonkar,P., Vu,L. & Nomura,M. Evidence for separable functions of Srp1p, the yeast homolog of importin alpha (Karyopherin alpha): role for Srp1p and Sts1p in protein degradation. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6062-6073 (2000).
183. Kussel,P. & Frasch,M. Yeast Srp1, a nuclear protein related to Drosophila and mouse pendulin, is required for normal migration, division, and integrity of nuclei during mitosis. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 351-363 (1995).
184. Gardiner,F.C., Costa,R. & Ayscough,K.R. Nucleocytoplasmic trafficking is required for functioning of the adaptor protein Sla1p in endocytosis. *Traffic*. **8**, 347-358 (2007).
185. Solsbacher,J., Maurer,P., Bischoff,F.R. & Schlenstedt,G. Cse1p is involved in export of yeast importin alpha from the nucleus. *Mol. Cell Biol.* **18**, 6805-6815 (1998).
186. Solsbacher,J., Maurer,P., Vogel,F. & Schlenstedt,G. Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin alpha. *Mol. Cell Biol.* **20**, 8468-8479 (2000).
187. Nikolaev,I., Cochet,M.F. & Felenbok,B. Nuclear import of zinc binuclear cluster proteins proceeds through multiple, overlapping transport pathways. *Eukaryot. Cell* **2**, 209-221 (2003).
188. Chan,C.K., Hubner,S., Hu,W. & Jans,D.A. Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery. *Gene Ther.* **5**, 1204-1212 (1998).
189. Stochaj,U., Bossie,M.A., van Zee,K., Whalen,A.M. & Silver,P.A. Analysis of conserved binding proteins for nuclear localization sequences. *J. Cell Sci.* **104** (Pt 1), 89-95 (1993).

190. Fontes,M.R. *et al.* Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin-alpha. *Biochem. J.* **375**, 339-349 (2003).
191. Etxebeste,O. *et al.* Basic-zipper-type transcription factor FlbB controls asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **7**, 38-48 (2008).
192. Giannakakou,P. *et al.* p53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat. Cell Biol.* **2**, 709-717 (2000).
193. Lam,M.H. *et al.* Nuclear transport of parathyroid hormone (PTH)-related protein is dependent on microtubules. *Mol. Endocrinol.* **16**, 390-401 (2002).
194. Yan,C., Leibowitz,N. & Melese,T. A role for the divergent actin gene, ACT2, in nuclear pore structure and function. *EMBO J.* **16**, 3572-3586 (1997).
195. Giri,D.K. *et al.* Endosomal transport of ErbB-2: mechanism for nuclear entry of the cell surface receptor. *Mol. Cell Biol.* **25**, 11005-11018 (2005).
196. Park,Y.J., Chodaparambil,J.V., Bao,Y., McBryant,S.J. & Luger,K. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J. Biol. Chem.* **280**, 1817-1825 (2005).
197. Canela,N. *et al.* The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 1158-1164 (2003).
198. Navadgi,V.M., Chandra,B.R., Mishra,P.C. & Sharma,A. The two *Plasmodium falciparum* nucleosome assembly proteins play distinct roles in histone transport and chromatin assembly. *J. Biol. Chem.* **281**, 16978-16984 (2006).
199. Wu,L., Osmani,S.A. & Mirabito,P.M. A role for NIMA in the nuclear localization of cyclin B in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* **141**, 1575-1587 (1998).
200. Archambault,V. *et al.* Targeted proteomic study of the cyclin-Cdk module. *Mol. Cell* **14**, 699-711 (2004).
201. Murphy,R., Watkins,J.L. & Wentz,S.R. GLE2, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* export factor RAE1, is required for nuclear pore complex structure and function. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1921-1937 (1996).
202. Kato,N., Brooks,W. & Calvo,A.M. The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by veA, a gene required for sexual development. *Eukaryot. Cell* **2**, 1178-1186 (2003).
203. Bok,J.W. & Keller,N.P. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* **3**, 527-535 (2004).
204. Bok,J.W., Noordermeer,D., Kale,S.P. & Keller,N.P. Secondary metabolic gene cluster silencing in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **61**, 1636-1645 (2006).

205. Bayram,O., Biesemann,C., Krappmann,S., Galland,P. & Braus,G.H. More Than a Repair Enzyme: *Aspergillus nidulans* Photolyase-like CryA Is a Regulator of Sexual Development. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3254-3262 (2008).
206. Blumenstein,A. *et al.* The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr. Biol.* **15**, 1833-1838 (2005).
207. Purschwitz,J. *et al.* Functional and physical interaction of blue- and red-light sensors in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* **18**, 255-259 (2008).
208. Millar,A.H., Heazlewood,J.L., Kristensen,B.K., Braun,H.P. & Moller,I.M. The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci.* **10**, 36-43 (2005).
209. Adams,K.L., Qiu,Y.L., Stoutemyer,M. & Palmer,J.D. Punctuated evolution of mitochondrial gene content: high and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 9905-9912 (2002).
210. Fisk,D.G., Walker,M.B. & Barkan,A. Molecular cloning of the maize gene *crp1* reveals similarity between regulators of mitochondrial and chloroplast gene expression. *EMBO J.* **18**, 2621-2630 (1999).
211. Manthey,G.M. & McEwen,J.E. The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**, 4031-4043 (1995).
212. Coffin,J.W., Dhillon,R., Ritzel,R.G. & Nargang,F.E. The *Neurospora crassa* *cya-5* nuclear gene encodes a protein with a region of homology to the *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein and is required in a post-transcriptional step for the expression of the mitochondrially encoded COXI protein. *Curr. Genet.* **32**, 273-280 (1997).
213. Liu,L. & McKeehan,W.L. Sequence analysis of LRPPRC and its SEC1 domain interaction partners suggests roles in cytoskeletal organization, vesicular trafficking, nucleocytosolic shuttling, and chromosome activity. *Genomics* **79**, 124-136 (2002).
214. Lurin,C. *et al.* Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* **16**, 2089-2103 (2004).
215. Small,I.D. & Peeters,N. The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 46-47 (2000).
216. Ding,Y.H., Liu,N.Y., Tang,Z.S., Liu,J. & Yang,W.C. *Arabidopsis* GLUTAMINE-RICH PROTEIN23 is essential for early embryogenesis and encodes a novel nuclear PPR motif protein that interacts with RNA polymerase II subunit III. *Plant Cell* **18**, 815-830 (2006).
217. Lahmy,S. *et al.* A chloroplastic RNA-binding protein is a new member of the PPR family. *FEBS Lett.* **480**, 255-260 (2000).

218. Mancebo,R., Zhou,X., Shillinglaw,W., Henzel,W. & Macdonald,P.M. BSF binds specifically to the bicoid mRNA 3' untranslated region and contributes to stabilization of bicoid mRNA. *Mol. Cell Biol.* **21**, 3462-3471 (2001).
219. Meierhoff,K., Felder,S., Nakamura,T., Bechtold,N. & Schuster,G. HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *Plant Cell* **15**, 1480-1495 (2003).
220. Mili,S. & Pinol-Roma,S. LRP130, a pentatricopeptide motif protein with a noncanonical RNA-binding domain, is bound in vivo to mitochondrial and nuclear RNAs. *Mol. Cell Biol.* **23**, 4972-4982 (2003).
221. Nakamura,T., Meierhoff,K., Westhoff,P. & Schuster,G. RNA-binding properties of HCF152, an Arabidopsis PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. *Eur. J. Biochem.* **270**, 4070-4081 (2003).
222. Shadel,G.S. Coupling the mitochondrial transcription machinery to human disease. *Trends Genet.* **20**, 513-519 (2004).
223. Ellis,T.P., Helfenbein,K.G., Tzagoloff,A. & Dieckmann,C.L. Aep3p stabilizes the mitochondrial bicistronic mRNA encoding subunits 6 and 8 of the H⁺-translocating ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 15728-15733 (2004).
224. Kotera,E., Tasaka,M. & Shikanai,T. A pentatricopeptide repeat protein is essential for RNA editing in chloroplasts. *Nature* **433**, 326-330 (2005).
225. Gavin,A.C. *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147 (2002).
226. Andres,C., Lurin,C. & Small,I. The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression. *Physiologia Plantarum* **129**, 14-22 (2007).
227. Aleksenko,A. & Clutterbuck,A.J. Autonomous plasmid replication in *Aspergillus nidulans*: AMA1 and MATE elements. *Fungal. Genet. Biol.* **21**, 373-387 (1997).
228. Gems,D., Johnstone,I.L. & Clutterbuck,A.J. An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* **98**, 61-67 (1991).
229. Harispe,L., Portela,C., Scazzocchio,C., Penalva,M.A. & Gorfinkiel,L. Ras GTPase-activating protein regulation of actin cytoskeleton and hyphal polarity in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **7**, 141-153 (2008).
230. Virag,A., Lee,M.P., Si,H. & Harris,S.D. Regulation of hyphal morphogenesis by cdc42 and rac1 homologues in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **66**, 1579-1596 (2007).
231. Veith,D., Scherr,N., Efimov,V.P. & Fischer,R. Role of the spindle-pole-body protein ApsB and the cortex protein ApsA in microtubule organization and nuclear migration in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Sci.* **118**, 3705-3716 (2005).

232. Araujo-Bazan,L., Penalva,M.A. & Espeso,E.A. Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **67**, 891-905 (2008).
233. Cheng,J., Park,T.S., Fischl,A.S. & Ye,X.S. Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* **21**, 6198-6209 (2001).
234. Harris,S.D., Morrell,J.L. & Hamer,J.E. Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* **136**, 517-532 (1994).
235. Kopecka,M. & Gabriel,M. The aberrant positioning of nuclei and the microtubular cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae* due to improper actin function. *Microbiology* **144** (Pt 7), 1783-1797 (1998).
236. Palmer,R.E., Sullivan,D.S., Huffaker,T. & Koshland,D. Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **119**, 583-593 (1992).
237. Engqvist-Goldstein,A.E. & Drubin,D.G. Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 287-332 (2003).
238. Kobiela,A. & Fuchs,E. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 614-625 (2004).
239. Pruyne,D., Legesse-Miller,A., Gao,L., Dong,Y. & Bretscher,A. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 559-591 (2004).
240. Rafelski,S.M. & Theriot,J.A. Crawling toward a unified model of cell mobility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 209-239 (2004).
241. Revenu,C., Athman,R., Robine,S. & Louvard,D. The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 635-646 (2004).
242. Boldogh,I.R. & Pon,L.A. Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 450-462 (2006).
243. Koch,K.V., Suelmann,R. & Fischer,R. Deletion of mdmB impairs mitochondrial distribution and morphology in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **55**, 114-124 (2003).
244. Suelmann,R. & Fischer,R. Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **45**, 42-50 (2000).
245. Manthey,G.M., Przybyla-Zawislak,B.D. & McEwen,J.E. The *Saccharomyces cerevisiae* Pet309 protein is embedded in the mitochondrial inner membrane. *Eur. J. Biochem.* **255**, 156-161 (1998).

246. Rieder, S.E. & Emr, S.D. Overview of subcellular fractionation procedures for the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 3**, Unit (2001).
247. Kaksonen, M., Toret, C.P. & Drubin, D.G. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* **123**, 305-320 (2005).
248. Walther, T.C. *et al.* Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**, 998-1003 (2006).
249. Pelham, R.J., Jr. & Chang, F. Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Cell Biol.* **3**, 235-244 (2001).
250. Momany, M. Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 580-585 (2002).
251. Horio, T. & Oakley, B.R. The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **16**, 918-926 (2005).
252. Lehmler, C. *et al.* Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **16**, 3464-3473 (1997).
253. Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D.D., Gierz, G., Lopez-Franco, R. & Bracker, C.E. Evidence that Spitzenkorper behavior determines the shape of a fungal hypha: a test of the hyphoid model. *Exp. Mycol.* **19**, 153-159 (1995).
254. Harris, S.D. *et al.* Polarisome meets Spitzenkorper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot. Cell* **4**, 225-229 (2005).
255. Harris, S.D. Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *Int. Rev. Cytol.* **251**, 41-77 (2006).
256. Steinberg, G. On the move: endosomes in fungal growth and pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 309-316 (2007).
257. Steinberg, G. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryot. Cell* **6**, 351-360 (2007).
258. Fischer-Parton, S. *et al.* Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J. Microsc.* **198**, 246-259 (2000).
259. Valdez-Taubas, J. & Pelham, H.R. Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr. Biol.* **13**, 1636-1640 (2003).
260. Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A. & Steinberg, G. A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J.* **25**, 2275-2286 (2006).

261. Wedlich-Soldner,R., Straube,A., Friedrich,M.W. & Steinberg,G. A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **21**, 2946-2957 (2002).
262. Drubin,D.G., Miller,K.G. & Botstein,D. Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J. Cell Biol.* **107**, 2551-2561 (1988).
263. Kaksonen,M., Sun,Y. & Drubin,D.G. A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**, 475-487 (2003).
264. Colwill,K., Field,D., Moore,L., Friesen,J. & Andrews,B. In vivo analysis of the domains of yeast Rvs167p suggests Rvs167p function is mediated through multiple protein interactions. *Genetics* **152**, 881-893 (1999).
265. Warren,D.T., Andrews,P.D., Gourlay,C.W. & Ayscough,K.R. Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *J. Cell Sci.* **115**, 1703-1715 (2002).
266. Adams,A.E., Cooper,J.A. & Drubin,D.G. Unexpected combinations of null mutations in genes encoding the actin cytoskeleton are lethal in yeast. *Mol. Biol. Cell* **4**, 459-468 (1993).
267. Holtzman,D.A., Yang,S. & Drubin,D.G. Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **122**, 635-644 (1993).
268. Quintero-Monzon,O., Rodal,A.A., Strokopytov,B., Almo,S.C. & Goode,B.L. Structural and functional dissection of the Abp1 ADFH actin-binding domain reveals versatile in vivo adapter functions. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3128-3139 (2005).
269. Peter,B.J. *et al.* BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495-499 (2004).
270. Sánchez-Ferrero JC & Peñalva MA. The Aspergilli: Genomics, Medical Applications, Biotechnology and Research Methods. Goldman,G. & Osmani,S. (eds.) (CRC Press, Florida,2006).
271. Engqvist-Goldstein,A.E. *et al.* RNAi-mediated Hip1R silencing results in stable association between the endocytic machinery and the actin assembly machinery. *Mol. Biol. Cell* **15**, 1666-1679 (2004).
272. Ayscough,K.R. *et al.* High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J. Cell Biol.* **137**, 399-416 (1997).
273. Taheri-Talesh,N. *et al.* The Tip Growth Apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1439-1449 (2008).
274. Gundelfinger,E.D., Kessels,M.M. & Qualmann,B. Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 127-139 (2003).

275. Wedlich-Soldner,R., Bolker,M., Kahmann,R. & Steinberg,G. A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J.* **19**, 1974-1986 (2000).
276. Lin,X. & Momany,M. The *Aspergillus nidulans* swoC1 mutant shows defects in growth and development. *Genetics* **165**, 543-554 (2003).
277. Yamashita,R.A. & May,G.S. Constitutive activation of endocytosis by mutation of myoA, the myosin I gene of *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* **273**, 14644-14648 (1998).
278. Pearson,C.L., Xu,K., Sharpless,K.E. & Harris,S.D. MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3658-3672 (2004).

ANEXO: Publicaciones científicas

Nuclear Export of the Transcription Factor NirA Is a Regulatory Checkpoint for Nitrate Induction in *Aspergillus nidulans*[†]

Andreas Bernreiter,¹ Ana Ramon,^{2,‡} Javier Fernández-Martínez,³ Harald Berger,¹
Lidia Araújo-Bazan,³ Eduardo A. Espeso,³ Robert Pachlinger,¹ Andreas Gallmetzer,¹
Ingund Anderl,^{1,§} Claudio Scazzocchio,^{2,4} and Joseph Strauss^{1,*}

Fungal Genetics and Genomics Unit, Austrian Research Centers and BOKU Vienna, Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria¹; Institut de Genetique et Microbiologie, Université Paris-Sud, F-91405 Orsay Cedex, France²; Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid 28040, Spain³; and Institut Universitaire de France, Paris, France⁴

Received 16 March 2006/Returned for modification 31 July 2006/Accepted 30 October 2006

NirA, the specific transcription factor of the nitrate assimilation pathway of *Aspergillus nidulans*, accumulates in the nucleus upon induction by nitrate. NirA interacts with the nuclear export factor KapK, which bridges an interaction with a protein of the nucleoporin-like family (NplA). Nitrate induction disrupts the NirA-KapK interaction in vivo, whereas KapK associates with NirA when this protein is exported from the nucleus. A KapK leptomycin-sensitive mutation leads to inducer-independent NirA nuclear accumulation in the presence of the drug. However, this does not lead to constitutive expression of the genes controlled by NirA. A *nirA^{c1}* mutation leads to constitutive nuclear localization and activity, remodeling of chromatin, and in vivo binding to a NirA upstream activation sequence. The *nirA^{c1}* mutation maps in the nuclear export signal (NES) of the NirA protein. The NirA-KapK interaction is nearly abolished in NirA^{c1} and NirA proteins mutated in canonical leucine residues in the NirA NES. The latter do not result in constitutively active NirA protein, which implies that nuclear retention is necessary but not sufficient for NirA activity. The results are consistent with a model in which activation of NirA by nitrate disrupts the interaction of NirA with the NplA/KapK nuclear export complex, thus resulting in nuclear retention, leading to AreA-facilitated DNA binding of the NirA protein and subsequent chromatin remodeling and transcriptional activation.

Nitrate, one of the most abundant nitrogen compounds in soil, is metabolized by microorganisms and plants. In the saprophytic fungus *Aspergillus nidulans*, nitrate utilization involves transcription of the nitrate transporter and nitrate- and nitrite-reductase genes (42). Transcriptional activation of these genes occurs upon induction by nitrate in the absence of repressing nitrogen sources (ammonium, glutamine), and it is strictly dependent on the synergistic, positive action of the pathway-specific Cys₆Zn₂ binuclear cluster factor NirA and the GATA factor AreA (3, 33, 35, 50). *nirA* and *nirA*, encoding nitrate and nitrite reductases, respectively, are transcribed from a bidirectional promoter containing four NirA and ten AreA-binding sites of varying functional importance (see Fig. 4B for the most relevant NirA and AreA binding sites) (33, 46, 55). This promoter undergoes a drastic chromatin rearrangement upon induction. AreA, necessary for both transcriptional activation and chromatin rearrangement, is inactivated by multiple mechanisms elicited by the presence of preferred nitrogen sources leading to repression (2, 32). At least one of the GATA

sites (GATA site 5) is permanently occupied by AreA (33). In contrast, NirA binding site 2 becomes occupied shortly after nitrate induction, but this occupancy is lost again when cultures are repressed by ammonium. NirA occupancy at promoter sites is AreA dependent (5). Protein-protein interactions, as shown for these nitrate regulators in *A. nidulans* (34) and in *Neurospora crassa* (16), may underlie the involvement of AreA in NirA binding to site 2.

Considerable experimental (11, 30, 59, 62) and genomic evidence (<http://www.broad.mit.edu>, and <http://www.fgsc.net>) suggest that this regulatory mechanism is conserved in the filamentous ascomycetes, although clustering of the structural genes is not always conserved (31) and functionally redundant nitrate transporters have only been identified in *A. nidulans* thus far (60).

The eukaryotic nuclear membrane allows regulatory signals to modulate the subcellular distribution of transcription factors. Some Cys₆Zn₂ binuclear cluster proteins such as *Saccharomyces cerevisiae* Gal4p, Put3p, or Leu3p (4, 7, 51) are constitutively bound to their cognate UASs, and induction occurs by unmasking of their activation domains (28, 29, 61). In contrast, PrnA is constitutively located in the nucleus but necessitates induction to bind DNA (21, 44), whereas Hap1p enters the nucleus and binds DNA in response to its specific ligand (23, 24, 27). NirA is located in the cytoplasm in the absence of nitrate (the inducer) and accumulates in the nucleus upon induction. Replacement of inducer by neutral (noninducing and nonrepressing, e.g., urea or arginine) or repressing (ammonium) nitrogen sources leads to dramatically rapid redistribution of NirA to the cytosol (5).

* Corresponding author. Mailing address: Fungal Genetics and Genomics Unit, Austrian Research Centers and BOKU Vienna, Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria. Phone: 43-1-36006-6720. Fax: 43-1-36006-6392. E-mail: joseph.strauss@boku.ac.at.

† Supplemental material for this article may be found at <http://mcb.asm.org/>.

‡ Present address: Sección Bioquímica, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá, 4225, CP 11400 Montevideo, Uruguay.

§ Present address: Institute for Molecular Biotechnology, Technical University Graz, A-8020 Graz, Austria.

Published ahead of print on 20 November 2006.

Karyopherins are essential mediators of inward and outward trafficking of macromolecules through the nuclear pore complex (49, 54). Thus, the interaction of transcription factors with cognate karyopherins is a possible regulatory checkpoint both at the level of nuclear import and export. Activation of the *S. cerevisiae* anti-oxidant response upregulator Yap1p occurs directly by masking a nuclear export signal (NES) through the formation of an intramolecular disulfide bridge (12, 64). This process prevents the interaction with Crm1p, the main yeast exportin, thus resulting in accumulation of Yap1p in the nucleus (12).

The identification of NirA interacting proteins and the characterization of the constitutive mutant *nirA^{c1}* (10, 42) presented below implies that nitrate acts on NirA by disrupting its interaction with the nuclear export machinery, thus resulting in their nuclear retention and subsequent transcriptional activation and that the constitutive mutation mimics this effect.

MATERIALS AND METHODS

Strains, plasmids, and genetic techniques. The *A. nidulans* and *S. cerevisiae* strains and transformation plasmids are listed in Tables S1, S2, and S3 in the supplemental material. *Escherichia coli* strain JM109 was used for routine plasmid propagation. The *nirA^{c1}* mutation was mapped according to the procedure described by Burger et al. (8) except that strain *areA18 nirA^{d106}* was used as the recipient strain for transformation of the overlapping PCR fragments derived from the *nirA^{c1}* strain. Plasmid and strain constructions are described in the supplemental material.

***S. cerevisiae* growth conditions.** All strains were grown at 30°C. Media and genetic methods used to construct and screen the two-hybrid libraries and to test for protein-protein interactions followed the instruction manual of the kit provider (HybriZAP-2.1 XR library construction kit instruction manual; Stratagene). Yeast cells were transformed with DNA by using the lithium acetate transformation method (20).

***A. nidulans* growth conditions and techniques.** *A. nidulans* growth conditions and techniques were as published previously (33, 35). Transformation was as described by Tilburn et al. (56).

Preparation of cDNA library and yeast two-hybrid screen. Nitrate-induced cultures of *A. nidulans* have been used to prepare mRNA as a template for the cDNA prey library, which was prepared by using the HybriZAP-2.1 XR library system. For construction and quality control of the library, the instructions of the manufacturer were followed. Titers of the amplified HybriZAP-2.1 library were in the range of 10¹⁰ PFU/μl. Transformation of the NirA bait fragments (see supplemental material) with the *A. nidulans* cDNA library was performed by using a high-efficiency lithium acetate transformation protocol (20). Further analysis of the potential interaction partners and elimination of false-positive interactions were done according to the instructions in the same publication. Selected clones positive for *HIS3* and *ADE2* expression were further tested for β-galactosidase activity. The plasmids encoding the preys were finally rescued from yeast by *E. coli* transformation and sequenced. The *kapK* cDNA was used in fusions to either the GAL4p-binding domain (BD; bait fusion) or the GAL4p activation domain (AD; prey fusion). Interaction with NplA (amino acids 80 to 512) was tested with the BD-KapK fusion since an autoactivation sequence is present in NplA. Interactions with NirA (NirA bait 1, positions 1 to 229) was tested by using both the AD-KapK fusion (BD-NirA/AD-KapK) and the BD-KapK fusion (AD-NirA/BD-KapK). In these tests, KapK overexpression resulted in toxicity to the yeast strains. The toxicity of the expressed proteins affects the plasmid copy number, making quantitative β-galactosidase determination unreliable (52). We thus assessed all interactions involving KapK by complementation of the *ade2* mutation.

β-Galactosidase assay in yeast extracts. The yeast strains were grown in triplicate assays overnight at 30°C in appropriate selective medium. The cells were washed once with sterile water and collected by centrifugation, and the pellet was resuspended in YPAD medium to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.2. These cultures were grown at 30°C to an OD₆₀₀ of 0.8 before being harvested. Pelleted cells were washed and finally resuspended in 500 μl of sodium phosphate buffer (50 mM Na₃PO₄, 1 mM EDTA [pH 8.0]). Then, 500-μl glass beads (0.75 to 1 mm in diameter) were added to the tubes, and the cells were broken in a RiboLyser (Hybaid, Heidelberg, Germany). Cell debris was

removed by centrifugation steps, and the protein concentration in the crude protein extracts was determined (BCA assay; Pierce); the liquid β-galactosidase assay, using ONPG (*o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) as the substrate, was done as described for yeast protein extracts (48). The specific β-galactosidase activities (Miller units) were calculated as described previously (48).

Recombinant protein expression, purification, and column binding assay. Purification of glutathione *S*-transferase (GST) fusion proteins. Expression of GST fusion proteins in *E. coli* BL21 cells harboring vector pGEX4T1 was achieved according to our published protocol (55). Due to a lower yield of the NplA fusion protein, the scale of this purification was increased fivefold (1.25 liter). Crude cell preparations were loaded onto GST-agarose columns (Sigma Europe), washed extensively, and subsequently incubated with the in vitro transcription-translation products (see below). KapK was in vitro translated using the coupled transcription-translation reticulocyte lysate system provided by Promega (Mannheim, Germany). The reaction was performed with vector pGAD-THKAP as a template for expression and ³⁵S-labeled methionine (GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) for protein labeling.

To detect recombinant protein-protein interactions, 500 μl of gel slurry packed in columns was equilibrated with column buffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris [pH 7.5]) and subsequently loaded with crude extracts containing GST fusion proteins. Columns were washed extensively and then incubated with 50 ng of [³⁵S]KapK for 1 h in binding buffer (50 mM Tris [pH 7.5], 2 mM dithiothreitol). Columns were washed with washing buffer containing increasing salt concentrations from 5 to 150 mM NaCl. Proteins still bound to glutathione-agarose after all of the washing steps were eluted with 5 mM reduced glutathione–50 mM Tris (pH 8), and fractions of 300 μl were collected. Wash and elution fractions were then analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), followed by Coomassie blue staining and autoradiography, respectively.

Fluorescence microscopy. Fluorescence microscopy was performed as described by Berger et al. (5). Green fluorescent protein (GFP) fusion proteins were induced by 100 pM diethylstilbestrol (DES; Sigma). The media and nitrogen sources used were the same as those used to investigate transcriptional activation, except that 3 mM arginine was used for the noninduced, derepressed (ND) conditions due to the high level of mycelial vacuolization observed on 5 mM urea in *areA600* strains.

Transcription analysis, in vivo footprinting, and investigation of nucleosome positioning. Strains were precultured on 1.25 mM ammonium D(+) tartrate as the sole nitrogen source for 7 h at 37°C as described previously (33, 35). After washing and resuspension on fresh minimal medium, 10 mM ammonium D(+) tartrate (noninducing, repressing [NR] conditions) or 5 mM urea (ND conditions) or 10 mM NaNO₃ (inducing, derepressing [ID] conditions) or 10 mM ammonium D(+) tartrate plus 10 mM NaNO₃ (inducing, repressing [IR] conditions) were added. The cultures were grown for a further 2 h before harvesting. Northern analysis was carried out according to published procedures (33). The relative intensities of the signals were calculated using the ImageQuant software (Molecular Dynamics) from phosphorimages (Storm; Molecular Dynamics, Inc.). Normalized *niiA* and *niaD* signal intensities were obtained by dividing the intensity of the *niiA* or *niaD* signal by the intensity of the actin gene signal, respectively. Reverse transcription quantitative real-time PCR used the primers 5'-GCGACGACGACAACGGCAAATACT and 5'-CATACGCCCTCAAACGG ATGACAG for amplification of *niiA* and the primers 5'-TGGAAACCGCT GCAGCAAGACAT and 5'-CAGGCCCGCAAAACCAAAACCAT for *niaD*. All signals were normalized to the constitutively transcribed actin gene (*acnA*) by using the primers 5'-CGAGCGCGGATACACCTTC and 5'-TACGGACGTC GACATCACAC. The Bio-Rad (Hercules, CA) MyiQ cycler was used as device and the platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) for cDNA synthesis and consecutive PCR. The *niiA* and *niaD* signal intensities were normalized by dividing these values by the values obtained for the *acnA* (actin) signal. Micrococcal nuclease (MNase) digestion and indirect end labeling was performed as described previously (33). Methylation protection in vivo footprinting of the NirA binding site 2 in the *niiA-niaD* intergenic region was carried out as described by Wolschek et al. (63).

Construction of S-tagged *kapK* and chromatin immunoprecipitation (ChIP). The S-tagged KapK-expressing strain was constructed by using the epitope-tagging techniques described by Yang et al. (66). Genomic fragments corresponding to 2.5 kb of the 3' end of the *kapK* coding region and 1.5 kb of the 3' untranslated region and a fragment containing the S-tag fused to the selectable marker *pyrG* gene from *Aspergillus fumigatus* were amplified with specific primers. These three fragments were fused to yield a PCR fragment that was used in transformation in a *pyrG89 A. nidulans* strain. Transformants were selected as uracil prototrophs and purified, and the integration of the construct was analyzed by Southern blotting. The plasmid containing the S-tag expressing fragment and

TABLE 1. Summary of yeast two-hybrid interactions between NirA, KapK, and NplA^a

Vector	Interaction ^b			
	AD-Tag	AD-NplA	AD-KapK	AD-NirA
BD-p53	+	–	–	–
BD-NirA	–	+	+	+
BD-KapK	–	+	ND	+

^a Yeast two-hybrid interactions were monitored by complementation of the *ade2* mutation. Bait vectors containing the GAL4 DNA-binding domain (BD) were constructed to result in a fusion with a control protein (BD-p53), with NirA1-229 (BD-NirA), or with KapK (BD-KapK). Prey vectors containing the GAL4 AD were constructed to result in a fusion with a control protein (T-antigen, AD-Tag, interacting with p53), with NplA (AD-NplA), with KapK (AD-KapK), or with NirA (AD-NirA). The BD-NirA–AD-NirA interaction serves as an additional positive control due to the homodimerization element in the NirA protein (55).

^b +, Interaction; –, no interaction; ND, not determined.

was provided by Steven Osmani. The strain used as a recipient, TNO2A3 (*pyroA4 pyrG89 ΔnkuA*), which carries the *nkuA* deletion allele that increases the homologous recombination (36), was provided by Berl Oakley.

ChIP was carried out as described previously (40), with the following modifications. Conidia (10⁸) were inoculated in *Aspergillus* minimal medium with arginine as the sole nitrogen source and then grown for 14 h at 37°C. Cultures were induced by 10 mM nitrate for 30 min, followed by a shift to repressing conditions (10 mM ammonium). Immediately before the medium shift the induced sample was withdrawn (inducing conditions and 0-min repression), and incubation under repressing conditions proceeded for 10 min (sample 10 min) or 30 min (sample 30 min). Mycelia were treated with a 1% final concentration of formaldehyde for 15 min. Fixation was stopped with 125 mM glycine, and the cultures were filtered and immediately frozen in liquid nitrogen. Then, 100 mg of frozen mycelium was sonicated in 1 ml of 50 mM HEPES KOH (pH 7.5)–140 mM NaCl–1 mM EDTA (pH 7.5)–1% Triton X-100–0.1% sodium deoxycholate–1× fungal protease inhibitor mix (Promega) for two pulses of 30 s with 1 min of resting. The insoluble debris was pelleted by centrifugation, and the soluble fraction was stored at –80°C. The equivalent of 200 μg of protein was used for immunoprecipitation with S-tag antibody (ab19321; Abcam), and 20 μg of protein was used to determine the concentration of DNA (referred to as the input DNA). DNA was eluted by using a PCR purification kit (QIAGEN) column with 100 μl of 1 mM Tris-HCl (pH 8.5). A total of 5 μl of the elution was used for quantitative real-time PCR (myiQ cycler; Bio-Rad) using platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen).

The primers used for quantitative PCR were *niiA_nuc-1_F* (5'-GGAAATTC AGGCAGTGCATC-3') and *niiA_nuc-1_R* (5'-TAGGATCTGGAGTGTGGC TAGAG-3').

To detect the background signal of the immunoprecipitation reaction (control reactions), two different strains carrying no S-tagged version of KapK (*pabaA1* and *biA1* strains, respectively) were analyzed in parallel with the S-tagged *kapK* strain. Each ChIP experiment was repeated twice. The relative amounts of DNA were calculated by dividing the immunoprecipitated DNA by the input DNA. The standard deviation was calculated from at least two biological repetitions, and significance (*P* < 0.01) was determined by analysis of variance.

RESULTS

NirA interacts with a nucleoporin. Using overlapping fragments of NirA fused to the GAL4 DNA-binding domain as baits (see the scheme in Fig. S3 in the supplemental material), we searched for NirA interaction partners encoded by a mixed *A. nidulans* cDNA-GAL4 activation domain prey library in a yeast two-hybrid screen. Bait 4 of NirA spanning amino acids 612 to 892 contains a putative activation domain, leads to activation of the reporter gene in the absence of a prey plasmid, and hence could not be used for further screens (not shown). In the NirA bait 1 to bait 3 screen we isolated two overlapping prey clones (codons 80 to 512 and codons 127 to 512, respectively) corresponding to auto-called gene AN4595.3

(<http://www.broad.mit.edu>) interacting with bait 1 and bait 2. The interacting protein was designated Nup42 by De Souza et al. (13). To comply with *A. nidulans* gene nomenclature (9), we denoted the gene *nplA*, encoding a 512-residue NplA protein (named for nucleoporin-like protein A). The domain structure of NplA is similar to the vertebrate NLP1 nucleoporin-like protein (15) and hRIP/Rab (6, 19). An NplA-GFP fusion driven from the strong *gpdA* promoter (45) is localized in the nucleus (not shown), and De Souza et al. (13) have shown that NplA, when driven by its own promoter, localizes perinuclearly. NplA contains a 15-fold repeated Phe-Gly motif characteristic of nucleoporins (see Fig. S1A in the supplemental material), which occurs in pentamers with iterations such as FGQPV, FGQPA, FGQSS, FGQAS, FGKPS, and FGVPs. A putative N-terminal C3H1 zinc finger is predicted for NplA, and this feature is conserved in many putative nucleoporin-like proteins of fungi and metazoans (see Fig. S1B in the supplemental material). Consistent with the predicted redundancy of nucleoporins in the *A. nidulans* genome, deletion of the complete *nplA* open reading frame results in moderately impaired growth on complete medium and on all minimal media tested using different carbon and nitrogen sources, including ammo-

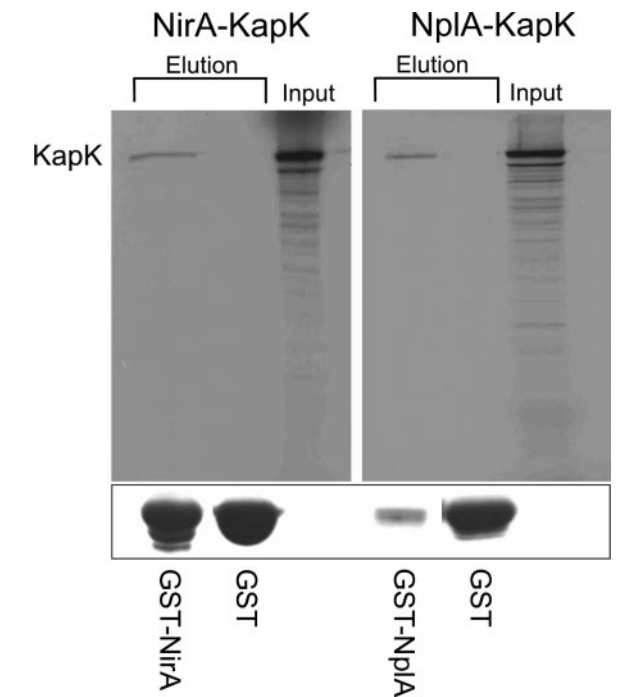


FIG. 1. KapK interacts in vitro with NirA and NplA. Glutathione-agarose columns containing GST-NirA, GST-NplA, or GST were loaded with [³⁵S]methionine-labeled KapK (input), which was prepared in a coupled in vitro transcription-translation system. Columns were washed (see Materials and Methods for details), and fractions were eluted using 5 mM reduced glutathione. The autoradiographs show KapK coeluted with fractions containing GST-NirA (NirA-KapK, left panel) or GST-NplA (NplA-KapK, right panel) fusion proteins. Columns containing only GST did not show KapK in the eluted fractions. KapK showed the expected mass of ~125 kDa, as determined with a molecular mass marker (not shown). Below the autoradiographs GST and GST fusion proteins of the same elution fractions are visualized by using SDS-PAGE and Coomassie blue staining.

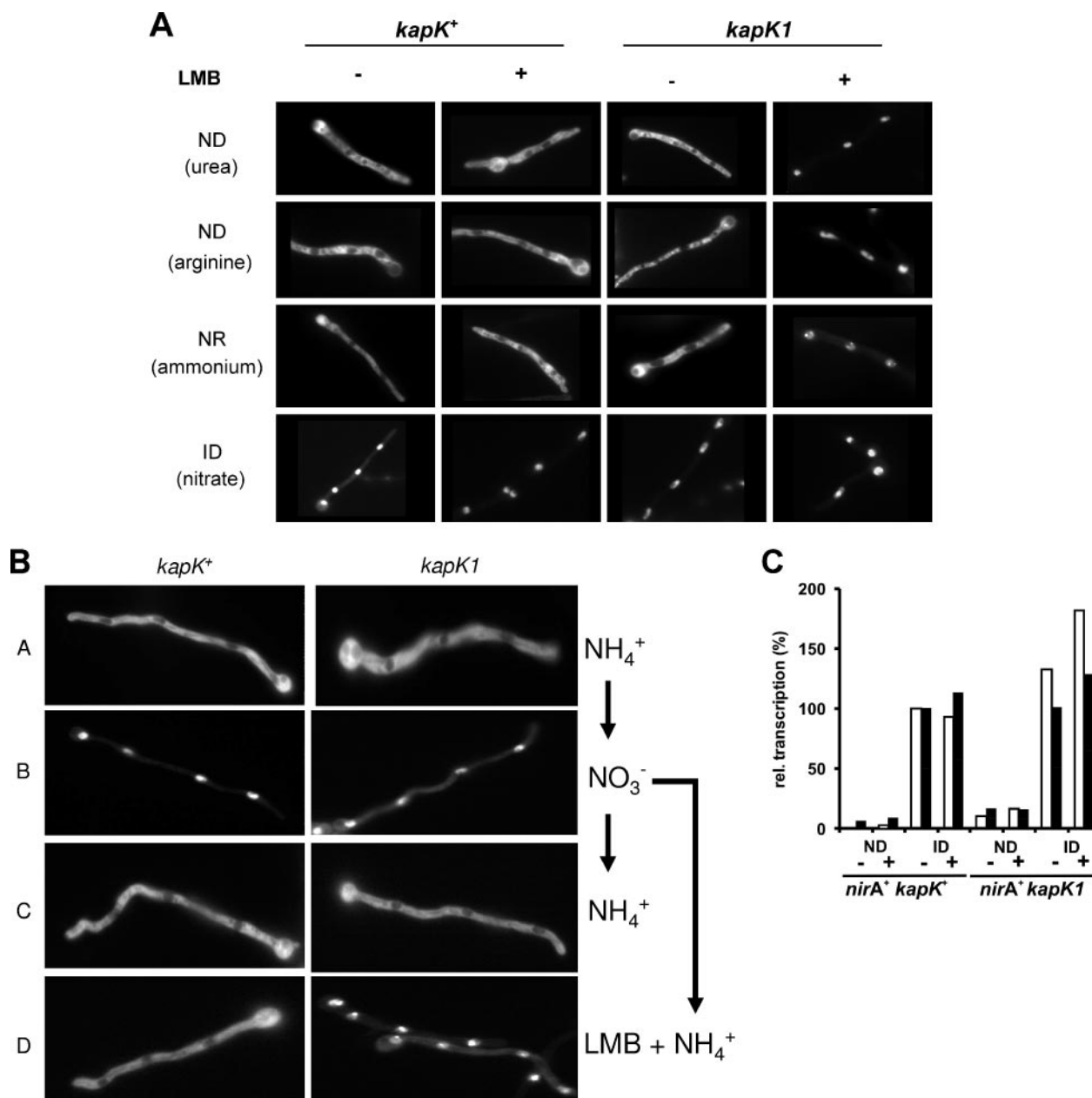


FIG. 2. Nuclear export of NirA-GFP is mediated by KapK. (A) Mycelia from the wild-type (*kapK⁺*) and the *kapK1* mutant strains were grown for 16 h at 25°C on coverslips in *Aspergillus* minimal medium under ND conditions (urea, arginine), NR conditions (ammonium), and ID conditions (nitrate). The effect of LMB on the subcellular localization of NirA was tested in the presence (+) or absence (-) of 10 ng of LMB/ml. (B) Analysis of the *kapK*-dependent nuclear export of NirA-GFP. Wild-type (*kapK⁺*) or *kapK* mutant (*kapK1*) cells were grown on coverslips in *Aspergillus* minimal medium containing ammonium (NH_4^+) as the sole nitrogen source for 16 h at 25°C (A). Nitrate (NO_3^-), was added to these cells and photographed after 2 min of incubation (B). Subsequently, the medium was withdrawn from the cultures and replaced again by ammonium-containing medium (NH_4^+) (C) or by medium containing ammonium and 10 ng of LMB/ml (LMB + NH_4^+) (D). Incubation proceeded for 10 min before the NirA-GFP localization was recorded. (C) Nuclear retention of NirA is not sufficient for transcriptional activation. Quantitative reverse transcription-PCR analysis of *niiA* (□) and *niaD* (■) transcription in a *nirA⁺ kapK⁺* strain was performed and compared to the LMB-sensitive *nirA⁺ kapK1* mutant. Cultures were pregrown for 10 h on a noninducing-derepressing nitrogen source (urea), harvested, and shifted onto media containing urea (ND) or nitrate (ID) as the sole nitrogen source either in the absence (-) or in the presence (+) of 10 ng of LMB/ml. Incubation proceeded for 2 h before the cultures were harvested and analyzed. The actin gene (*actA*) was used to normalize *niiA* and *niaD* expression. The transcriptional level of *niiA* and *niaD* in the nitrate-induced (ID) wild-type cultures in the absence of LMB (*nirA⁺ kapK⁺*, ID -) was set to 100%.

nium and glutamine. There were no specific effects on nitrate or nitrite, and the *nplA* deletion does not affect either *niiA* and *niaD* expression (as monitored by Northern blotting) or NirA localization under standard growth conditions (not shown).

The interaction of NirA and NplA is mediated by the Crm1p homologue KapK. We failed to show any direct in vitro interaction between NirA (positions 1 to 229) and NplA by coimmunoprecipitation of epitope-tagged proteins either directly

from crude yeast extracts or of purified epitope-tagged proteins produced in a reticulocyte cell-free system. This suggested that the NirA/NplA two-hybrid interaction is indirect and mediated through yet another protein. In a screen using bait 5 (full NirA sequence lacking the C-terminal 133 amino acids of the activation region), we isolated a prey plasmid coding for the C-terminal portion of a putative exportin (AN1401.2), suggesting that this could be the bridging protein (data not shown). This protein has recently been described to be involved in the nuclear export of the wide-domain nitrogen regulator AreA (57). The *S. cerevisiae* Crm1p factor and its homologues (CRM1/exportin-1 in higher eukaryotes) have been shown to interact with Leu-rich NESs (18). Inspection of the NirA 1 and NirA 2 baits revealed the presence of a putative NES, and the Crm1p homologue KapK (encoded by *kapK*/AN1401.2) was thus a likely candidate to mediate the NirA-NplA interaction in the yeast assay. A complete cDNA of *kapK*, which encodes a 1,072-residue protein (GenBank accession no. AY555733), was cloned and used in two-hybrid assays with either the NplA region identified in the screen (amino acids 80 to 512) or with NirA bait 1 (amino acids 1 to 229). KapK interacts with both NplA and NirA. The yeast two-hybrid interactions between NirA, KapK, and NplA are summarized in Table 1.

NirA-KapK and KapK-NplA interact in vitro. We confirmed the interactions found in the yeast two-hybrid system by in vitro assays. In these experiments the NirA bait 1 and NplA were expressed as GST fusion proteins in *E. coli* and KapK was expressed as [³⁵S]methionine-labeled protein in a coupled transcription-translation assay. The GST control proteins, GST-NirA bait1 fusions or GST-NplA fusions present in crude *E. coli* extracts were loaded onto glutathione columns and incubated with [³⁵S]KapK. Columns were extensively washed and subsequently eluted using reduced glutathione. In SDS-PAGE, GST proteins were revealed by Coomassie blue staining, and [³⁵S]KapK was detected by radiography. In both cases, [³⁵S]KapK specifically interacted with the fusion proteins but not with the GST control, providing additional biochemical evidence for the interactions identified in the yeast two-hybrid screen (Fig. 1).

NirA export from the nucleus is abolished in vivo in a leptomycin B (LMB)-sensitive *kapK1* mutant. We then investigated whether KapK is directly involved in NirA nuclear export in *A. nidulans*. Since CRM1 is essential for *Schizosaccharomyces pombe* (1) and *S. cerevisiae* (53), we constructed a conditional *kapK* mutant. In higher eukaryotes and in *S. pombe*, CRM1/exportin-1 is specifically inhibited by LMB through its covalent modification of a cysteine residue (26) present in the central conserved region. In *S. cerevisiae* Crm1p and *A. nidulans* KapK, a threonine substitutes for the target cysteine, resulting in LMB resistance (37). We constructed by allelic substitution a strain of *A. nidulans* sensitive to LMB, carrying the *kapK1* T525C mutation, equivalent to the T539C mutation of *S. cerevisiae* (37) and of Crm1 in *A. nidulans* (57). We first tested the nuclear retention phenotype of the *kapK1* T525C mutation using a GFP chimera, denoted cNLS::NES::GFP, to which the simian virus 40 nuclear localization signal (NLS) and the PKI- α inhibitor NES had been attached, using as a control a second GFP fusion protein (cNLS::GFP) carrying the simian virus 40 NLS (cNLS::GFP) but

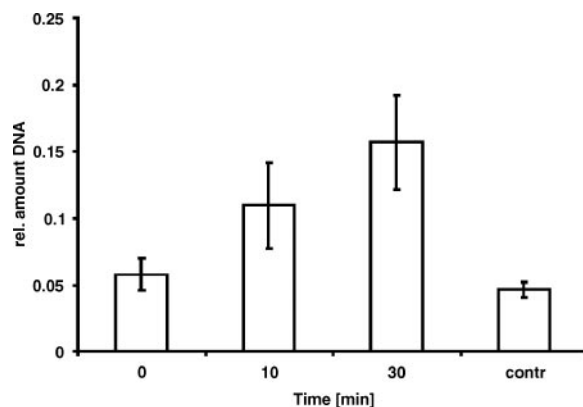


FIG. 3. KapK-NirA in vivo interaction at the NirA binding site in the *niiA-niaD* promoter. ChIP using anti-S-tag antibody directed against S-tagged KapK and amplifying precipitated DNA at the NirA binding site 2 in the *niiA-niaD* intergenic region. Nitrate-induced cultures were submitted to repression by a shift to ammonium-containing medium, and samples were taken immediately before the shift (0 min) and after 10 min (10) and 30 min (30) of incubation, respectively. Relative amounts of precipitated DNA compared to input DNA (for details see Materials and Methods) at two time points of repression are shown. ChIP reactions with the anti-S-tag antibody in a strain lacking the S-tag epitope at the *kapK* locus (contr) were used as controls for background amplification. Error bars indicate the standard deviations of at least three biological replicates.

not the NES. As predicted, LMB treatment results, in the *kapK1* mutant but not in the wild type, in nuclear retention of the cNLS::NES::GFP but not of cNLS::GFP (see Fig. S2 in the supplemental material).

The effect of *kapK1* in NirA-GFP localization was tested. In a *kapK*⁺, leptomycin-insensitive background, NirA-GFP is excluded from the nuclei when nitrate is absent. In the *kapK1* mutant background, however, leptomycin treatment resulted in exclusive nuclear localization under all tested conditions. Notably, these results show that nitrate is not required for NirA nuclear accumulation (Fig. 2A). In the wild type, nuclear NirA-GFP rapidly relocalizes to the cytosol upon shifting cells to ammonium. In the *kapK1* strain, LMB fully prevented NirA-GFP relocalization after transfer to ammonium (Fig. 2B). These results imply that KapK is the only exportin protein able to translocate NirA from the nucleus to the cytoplasm in response to nitrate depletion. Figure 2C shows that nuclear retention in a *kapK1* strain does not result in constitutive expression of either *niiA* or *niaD*. The slightly elevated transcriptional level in strain *nirA*⁺ *kapK1* under ND conditions is not significant because inactivation of KapK1 by LMB has no additional effect. These results imply that the nuclear localization of NirA is required, but not sufficient, for transcriptional activation of NirA target genes.

In vivo, nitrate disrupts the NirA-KapK interaction. We have shown above that inactivation of the exportin recognizing a putative NES sequence in NirA results in a permanent, nitrate-independent, nuclear localization of NirA. These results strongly suggest that nuclear accumulation of NirA in response to nitrate induction results from the inhibition of export rather than from import activation. If this is the case, we should be able to detect NirA-KapK interactions under conditions in which NirA is exported (e.g., shifting the cultures

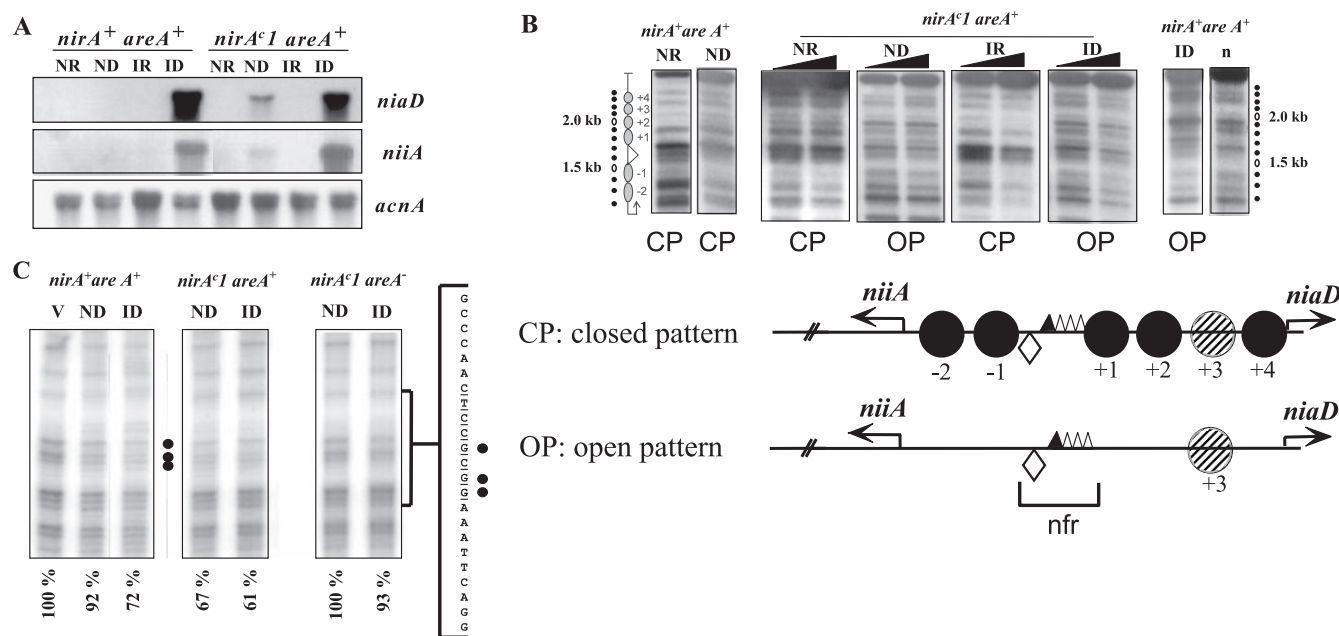


FIG. 4. *nirA*^{c1} phenotype. (A) Northern blots of *niiA* and *niiA* mRNAs in the *nirA*⁺ *areA*⁺ and the *nirA*^{c1} *areA*⁺ strains grown under ND (urea as the sole nitrogen source), ID (nitrate as the sole nitrogen source), IR (nitrate plus ammonium as the nitrogen sources), or NR (ammonium as the sole nitrogen source) conditions. The *acnA* (actin) hybridization serves as loading control. (B) Nucleosome positioning in the bidirectional *niiA*-*niaD* promoter region comparing *nirA*⁺ and *nirA*^{c1} strains in an *areA*⁺ background. Samples from the same mycelia as in panel A were incubated with increasing amounts of MNase (black triangles). The top panel shows an MNase digestion pattern of a *nirA*^{c1} mutant under all of the conditions described in panel A. Patterns of MNase digestion for the wild-type strain (*nirA*⁺, *areA*⁺) grown under the same conditions have been published previously; here we show two extreme (NR and ID) conditions as controls. A naked DNA control, also published previously, is also shown (lane n). The position of the DNA fragments is shown by dots to the side of the autoradiogram. A 100-bp DNA ladder run in these gels, used to calculate the position of the MNase cuts, is not shown for the sake of clarity. The positions of the nucleosomes are shown to the left of the autoradiograms and are numbered divergently from the nucleosome-free region (nfr) as referred to in reference 33. The DNA bands correspond exactly to those described in previous publications (33–35). These experiments were repeated several times with identical results. The bottom panel shows the two patterns of nucleosome organization of the *niiA*-*niaD* intergenic region, a closed pattern (CP) that is seen in the wild-type strain (*nirA*⁺ *areA*⁺) under NR, ND, and IR conditions and an open pattern (OP) that is seen only under ID conditions (33, 34). For the *nirA*^{c1} mutant the OP is seen also under ND conditions. The corresponding patterns are also indicated under all MNase digestion tracks in the upper panel. Positioned nucleosomes (CP) are depicted as closed circles and numbered divergently from the nucleosome-free region (nfr). In the open pattern there are no positioned nucleosomes in the intergenic region. The putative positioning of nucleosome +3 cannot be determined by MNase digestion and hence is depicted as a hatched circle. Transcription factor binding sites discussed in this study are shown as a lozenge (NirA binding site 2) and triangles (AreA binding sites 5 to 8). AreA binding site 5, which was shown to be occupied by the protein under all nitrogen conditions, is represented as a filled triangle. Transcription start points are indicated by arrows. (C) In vivo methylation protection of NirA site 2 in the wild-type strain (*nirA*⁺ *areA*⁺) and in *nirA*^{c1} strains with functional (*nirA*^{c1} *areA*⁺) and nonfunctional (*nirA*^{c1} *areA*⁻) AreA. Strains were grown under the conditions described above. V, in vitro-methylated control DNA. Filled circles indicate protected guanines within the NirA binding sequence that is shown to the side of the autoradiographs (site 2, underlined). The results of quantitative phosphorimager analysis are presented as the percent intensity of the relevant guanines within NirA binding site 2 compared to nonprotected guanines in the same lane. The relationship of the intensities between the three relevant guanines within the NirA binding sequence and the three nonprotected guanines in the in vitro-methylated DNA (V) was set to 100%. All panels are from the same experiment and were run in parallel in the same gel but are shown separately for the sake of clarity. Values under the panels indicate percentage of protection of the three relevant guanines.

from nitrate-induced to ammonium-repressed conditions; compare Fig. 2B), whereas we should not detect such interactions under conditions in which NirA accumulates in the nucleus (e.g., nitrate-induced conditions). To probe for this in vivo interaction in *A. nidulans*, we used ChIP analysis and monitored the presence of an S-tagged version of KapK at the NirA recognition site in the *niiA*-*niaD* promoter based on our previous observations that NirA binds immediately after nitrate induction and remains bound to its promoter sequence until at least 30 min of repression (35). The results presented in Fig. 3 show that under nitrate-induced conditions (0 min corresponds to samples taken immediately before the shift to repressing conditions) the amount of NirA binding site precipitated

with S-tagged KapK is at the background level (control using a strain without S-tagged KapK). In contrast, when cultures are shifted to repressing conditions (for 10 and 30 min), the amount of precipitated NirA-binding site significantly increases. These results suggest that KapK is not interacting with DNA-bound NirA under conditions of nitrate induction but associates with NirA upon ammonium repression, and this association results in the translocation of NirA to the cytosol.

A *nirA*-constitutive mutation (*nirA*^{c1}) leads to inducer-independent activity and maps in the putative NES. In genetic screens searching for mutants affected in the nitrate assimilation genes of *A. nidulans*, rare mutations have been selected that lead to an inducer-independent activation of the nitrate

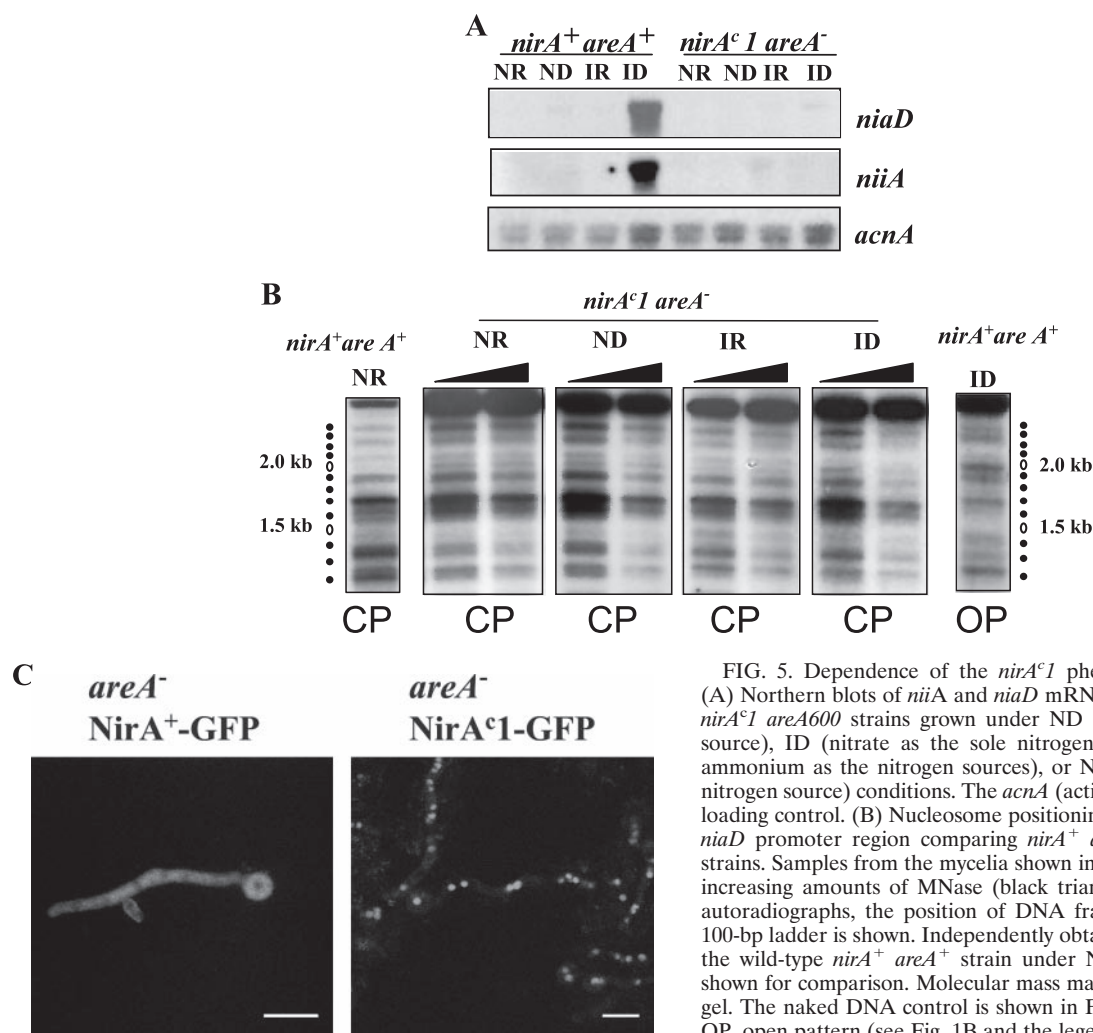


FIG. 5. Dependence of the *nirA^{c1}* phenotype on *areA* function. (A) Northern blots of *niiA* and *niaD* mRNAs in the *nirA⁺ areA⁺* and *nirA^{c1} areA⁶⁰⁰* strains grown under ND (urea as the sole nitrogen source), ID (nitrate as the sole nitrogen source), IR (nitrate plus ammonium as the nitrogen sources), or NR (ammonium as the sole nitrogen source) conditions. The *acnA* (actin) hybridization serves as a loading control. (B) Nucleosome positioning in the bidirectional *niiA-niaD* promoter region comparing *nirA⁺ areA⁺* and *nirA^{c1} areA⁶⁰⁰* strains. Samples from the mycelia shown in panel A were subjected to increasing amounts of MNase (black triangles). To the sides of the autoradiographs, the position of DNA fragments calculated from a 100-bp ladder is shown. Independently obtained control patterns from the wild-type *nirA⁺ areA⁺* strain under NR and ID conditions are shown for comparison. Molecular mass markers were run in the same gel. The naked DNA control is shown in Fig. 1B. CP, closed pattern; OP, open pattern (see Fig. 1B and the legend to this figure). (C) Sub-cellular localization of NirA as a GFP fusion protein in an *areA* mutant background. *areA* mutant strains ERE-*nirA⁺*-GFP (left) and ERE-*nirA^{c1}*-GFP (right) were grown as described in Materials and Methods for ~14 h under ND conditions with arginine as the sole nitrogen source (identical nuclear localization patterns were obtained with other ND nitrogen sources such as urea, proline, or hypoxanthine). Induction of the GFP fusion proteins was obtained by the addition of 100 pM DES 5 h prior to the microscopic observations. GFP localization was examined by confocal laser scanning microscopy, and the positions of the nuclei were determined by DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) staining (not shown). Scale bar, 10 μ m. Urea, used as a standard ND nitrogen source, resulted in unexpected high vacuolization of mycelia in *areA* strains and, consequently, observations on arginine rather than on urea are shown in this figure.

cluster and that map in the *nirA* gene (42, 47). We have determined the sequence of the *nirA^{c1}* allele and found a single alteration, i.e., a G2926T transversion resulting in a Gly167Val substitution. Gly167 lies within an amino acid sequence motif strongly conserved among NirA orthologues (see Fig. S3 in the supplemental material). This motif conforms to a canonical nuclear export signal (NES), but Gly167 is not one of the residues defining the consensus sequence.

A *nirA^{c1}* mutation results in partial constitutivity (Fig. 4A, ND) of both *niiA* and *niaD* transcription and in an open chromatin pattern in the *niiA-niaD* intergenic region under ND (i.e., the absence of nitrate and ammonium) conditions (Fig. 4B). This open pattern is obtained in the wild-type strain (*nirA⁺, areA⁺*) only in the presence of nitrate (Fig. 4B, ID). *nirA^{c1}* also results in occupancy of the NirA binding site 2 in the absence of inducer (Fig. 4C). As expected (47, 58), *nirA^{c1}* does not affect transcriptional repression of *niiA* and *niaD* by ammonium (Fig. 4A, IR). Ammonium also results in the positioning of all nucleosomes (i.e., a "closed" nucleosomal pattern, Fig. 1B, IR and NR; marked CP) and in the loss of NirA site 2 occupancy (not shown) in the *nirA^{c1}* background. *areA*

loss-of-function mutations are epistatic to *nirA^{c1}* as assessed by growth tests and enzyme assays (47, 58). This epistasis holds (Fig. 5A) at the level of the *niiA* and *niaD* mRNA steady states, at the level of protection of NirA binding site 2 (Fig. 4C, right panel), and at the level of chromatin rearrangements (Fig. 5B), confirming the essential role of AreA in these processes (33, 35).

Mutations in the NES abolish NirA interactions in yeast two-hybrid systems and nuclear export in *A. nidulans*. We have introduced alternative mutations in the region of the *nirA^{c1}* mutation replacing either one (Leu172Ala) or two (Leu172Ala

and Leu174Ala) canonical leucines of the NES consensus sequences by alanines. We then quantified by *lacZ* reporter enzyme measurements the effect of these mutations on NirA-NplA in comparison to the *nirA* wild-type and *nirA^{c1}* sequences in the yeast two-hybrid system. While the *nirA^{c1}* Gly167Val substitution within the NES strongly reduced NplA interaction, single Leu172Ala or double Leu172Ala Leu174Ala substitutions completely abolished the two-hybrid interaction of NirA with NplA (Fig. 6A). Because KapK bridges the NirA-NplA interaction, the same effect of the NES mutations should also be evident in NirA-KapK interactions. This is shown in Fig. 6B. The NirA-KapK interaction is strongly impaired in NirA^{c1}^{Gly167Val} and completely abolished in NirA^{L172A} and NirA^{L172/174A}.

A NirA-GFP driven from the very weak *nirA* promoter complements a *nirA* mutation, but no fluorescence is visible (5). We investigated the localization of NirA-GFP fusion proteins in strains expressing the human estrogen receptor α (hER) from a single-copy transgene in which the expression of NirA-GFP or NirA^{c1}-GFP is driven by a promoter containing an estrogen responsive element (ERE) and thus can be modulated to avoid gross overexpression (5, 41). NirA^{c1}-GFP localizes to the nucleus equally well in the presence and in the absence of nitrate and even in the presence of ammonium as the sole nitrogen source, whereas localization of NirA⁺-GFP in the nucleus is strictly nitrate dependent (Fig. 6C). In accordance with the yeast two-hybrid results, the substitutions of the "canonical" Leu172 and Leu174 within this motif also led to constitutive nuclear localization, confirming the functionality of the NES. Interestingly, these sequence changes result in a complete loss-of-function phenotype as assessed by both growth tests (no growth on nitrate and nitrite as sole nitrogen sources) and *nirA* and *nirD* Northern blots (results not shown). This implies that this region of NirA has an additional, probably structural, function in addition to promoting NirA nuclear export and that the *nirA^{c1}* mutation results in a *nirA* gain of function both at the level of nuclear retention and at the level of transcriptional activation. Notably, whereas AreA is essential for NirA constitutivity, it is not required for the nuclear retention of NirA^{c1} (Fig. 5C). This supports our previous proposal that AreA is not directly involved NirA nuclear localization (5).

DISCUSSION

We reported previously that nitrate induces rapid NirA accumulation in the nucleus (5). Three lines of evidence presented here demonstrate that this accumulation results from a blockage in nuclear export rather than from permitting nuclear import. First, in a hunt for NirA-interacting proteins we identified the exportin KapK and a member of the nuclear pore family of proteins, NplA. We showed by yeast two-hybrid analysis and in vitro assays that NirA directly binds KapK, and this protein bridges an interaction between NirA and the nuclear pore-like protein, NplA. The second line of evidence establishes that mutations in the NirA NES disrupt the NirA-KapK and subsequently the NirA-NplA interactions in the yeast two-hybrid system. In *A. nidulans*, NES mutations lead to a constitutive, nitrate-independent nuclear accumulation of NirA. Importantly, inactivation of KapK by LMB in an LMB-

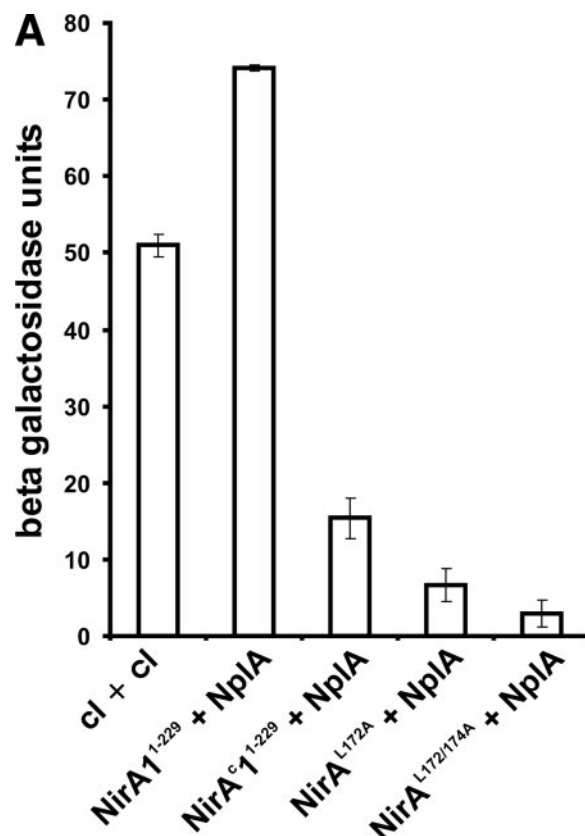
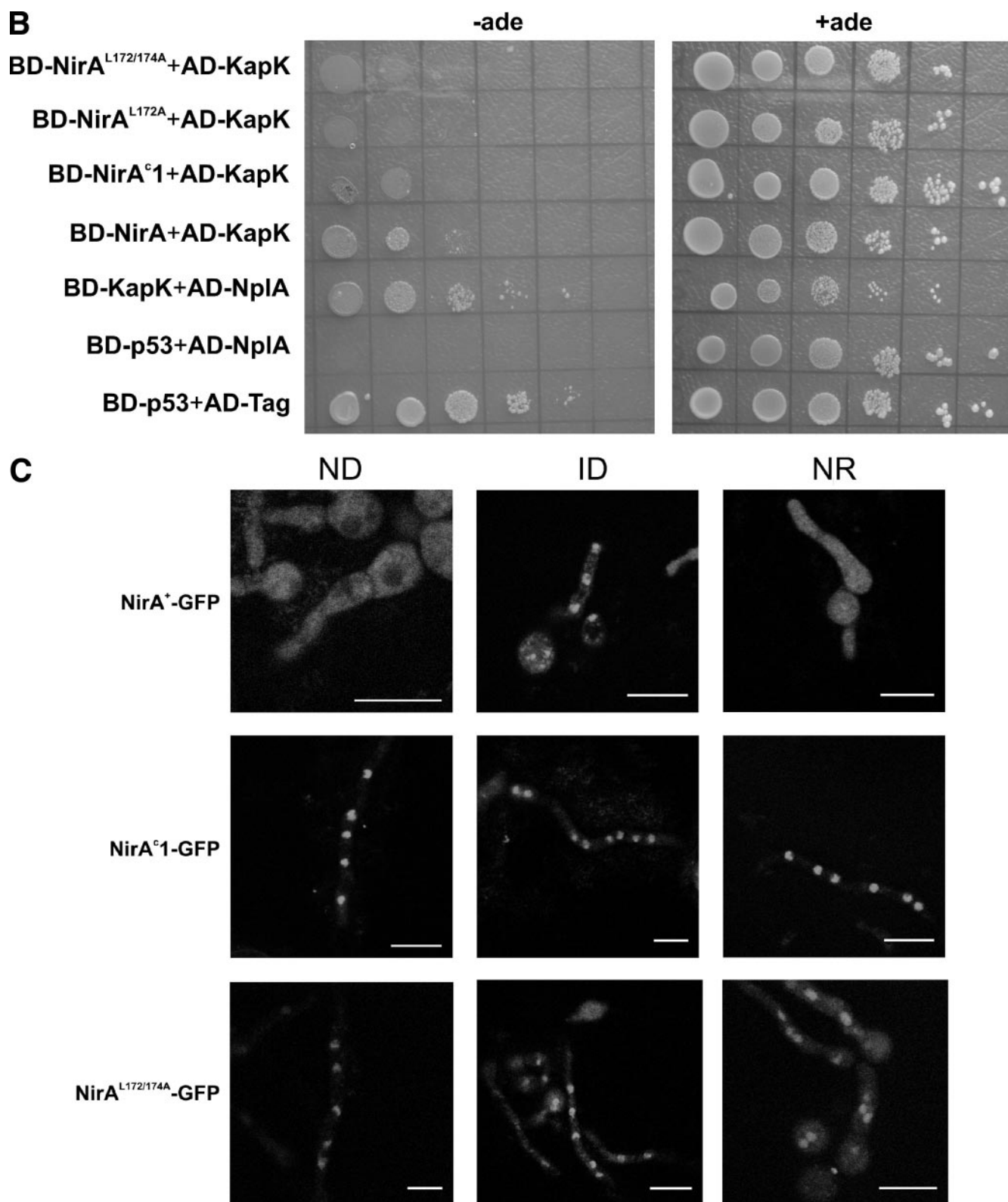


FIG. 6. Mutations in the NirA NES disrupt the interaction with nuclear export factors and lead to nuclear accumulation without nitrate. (A) Quantitative measure of the NirA-NplA interaction. Amino acids 1 to 229 of wild-type and mutant NirA proteins were expressed as fusions with the GAL4p DNA-binding domain (BD-NirA). The NplA protein (amino acids 80 to 512) was expressed as a fusion with the GAL4p activation domain (AD-NplA). BD-cl+AD-cl indicates the results obtained using the dimerization domain of the phage λ cI protein as a positive control in both bait and prey fusion proteins. BD-NirA+AD-NplA, BD-NirA^{c1}+AD-NplA, BD-NirA^{L172A}+AD-NplA, and BD-NirA^{L172/174A}+AD-NplA indicate the results obtained using as prey the AD-NplA⁸⁰⁻⁵¹² fragment and as bait the fragment 1-229 of NirA, carrying, respectively, no mutations, the *nirA^{c1}* mutation, or in vitro-constructed mutations in the NES as described in the text. The β -galactosidase activity of each bait-prey combination was determined according to the procedures described in Materials and Methods. (B) Yeast two-hybrid interactions of NirA NES mutants (amino acids 1 to 229) with KapK (amino acids 1 to 1072) and NplA (amino acids 80 to 512). Protein-protein interactions were monitored by complementation of the *ade2* mutation in the yeast two-hybrid strain PJ69-4A. Tenfold serial dilutions of liquid cultures grown to an OD₆₀₀ of 0.3 were spotted onto minimal medium (–leu, –trp) in the presence (+ade) or in the absence (–ade) of supplementing adenine. Photographs were taken after 4 to 5 days of incubation at 28°C. NirA wild-type protein (BD-NirA), with the constitutive mutation (BD-NirA^{c1}) and with the in vitro-constructed single NES mutation (BD-NirA^{L172A}) or the double NES mutation (BD-NirA^{L172/174A}), were expressed as a fusion with the Gal4p-binding domain. KapK was expressed either as a fusion with the GAL4p activation domain (AD-KapK) for interaction tests with NirA or with the GAL4p-binding domain (BD-KapK) for interaction tests with NplA. The latter protein was expressed as a fusion with the GAL4p activation domain (AD-NplA). Control proteins p53 and the large fragment of the T-antigen (see Materials and Methods) were expressed as a fusion with the GAL4p-binding domain (BD-p53) or with the GAL4p activation domain (AD-Tag), respectively. (C) Subcellular localization of NirA as a GFP fusion protein. Strains ERE-*nirA⁺*-GFP (top), ERE-*nirA^{c1}*-GFP (middle), and ERE-*nirA^{L172/174A}* (bottom) were grown as detailed in Materials and Methods for ~14 h under ND conditions (with arginine as the sole nitrogen source; identical nuclear



localization patterns were obtained with other ND nitrogen sources such as urea, proline, or hypoxanthine), under ID conditions (with nitrate as the sole nitrogen source), or under NR conditions (with ammonium as the sole nitrogen source). Induction of the GFP fusion proteins was obtained by the addition of 100 pM DES 5 h prior to the microscopic observations. GFP localization was examined by confocal laser scanning microscopy, and the position of the nuclei was determined by DAPI staining (not shown). Scale bar, 10 μ m. Urea, the standard ND nitrogen source in transcriptional analysis, chromatin studies, and in vivo footprinting, resulted in an unexpected high vacuolization of mycelia in *areA* mutant strains and, consequently, observations on arginine rather than on urea are shown in this figure and in Fig. 5C.

sensitive *kapK1* strain also leads to the same phenotype (permanent NirA nuclear accumulation) showing that nuclear import of NirA is nitrate independent. Consequently, we hypothesize that NirA nuclear import and export is a permanently active process under all nitrogen conditions but that the export process is disrupted when nitrate becomes available. Under these NirA-activating conditions, nuclear export would be blocked and NirA accumulates in the nucleus, eventually leading to transcriptional activation of the target genes. This hypothesis is supported by our third line of evidence, i.e., the finding that the exportin KapK can be precipitated in ChIP experiments from the NirA binding site in a *nirA*⁺ strain under conditions of NirA nuclear export (ammonium-repressing conditions) but cannot be detected in a significant amount at this binding site under conditions of nuclear accumulation (nitrate-inducing conditions). We propose that in the absence of nitrate NirA is a cargo for KapK and thus prevents its nuclear accumulation. Nuclear export would involve interactions with nucleoporins, including NplA. Nitrate would disrupt the interaction between KapK and the NES of NirA, thus preventing nuclear export. In light of these findings, it appears highly unlikely that nitrate induction specifically triggers the nuclear accumulation of NirA, an independent effect of induction on nuclear import rate is not, however, excluded.

In the major nuclear export mechanism, a Crm1p/CRM1/exportin 1 homologue recognizes a hydrophobic NES of a given nuclear protein and forms a ternary complex with Ran/GTP (see reference 43 for a review). This tripartite complex would then interact with nucleoporins. Interaction of CRM1/exportin-1 homologues with a number of nucleoporins has been reported in a number of different systems (see, for example, references 17, 18, 22, and 68). Our results suggest a role for a conserved putative nucleoporin-like protein, NplA. Exported cargoes do not interact directly with nucleoporins in agreement with our failure to detect any *in vitro* interactions between NirA and NplA and with the finding that KapK bridges this interaction. The conserved nature of such interactions is certainly of interest. Crm1p, the yeast homologue of KapK, serves as a bridging factor between the human NES-containing protein REV and several human and yeast nucleoporins (38). The yeast Crm1p and human CRM-1, orthologues of KapK, interact with NPL-1. This accounts for two-hybrid assays revealing an interaction between the NES of REV and the human NPL-1, followed by the failure to demonstrate a direct interaction between these proteins (15). The analogy with our results suggests a striking conservation of nuclear export pathways among eukaryotes. The deletion of the *nplA* gene has no specific phenotype, and this is in line with the multiplicity of putative nucleoporins found in the genome of *A. nidulans* (13). We must conclude that NplA is one of several nucleoporins able to interact with KapK. Inactivation of KapK, on the other hand, leads to nuclear accumulation of NirA, and these results argue against overlapping functions of exportins in NirA nuclear export and support an exclusive role for KapK in this process.

We were surprised by the finding that nuclear retention is necessary, but not sufficient, for the activation of NirA. While the inactivation of KapK by LMB in the *kapK1* strain grown in the absence of nitrate results in NirA nuclear accumulation, it does not lead to transcriptional activation of either *niiA* or

nirD (Fig. 2C). This suggests an additional role for nitrate in transforming NirA to its transcriptionally active form. The results from the *nirA*^{c1} gain-of-function mutation, which mimics nitrate induction not only for nuclear accumulation but also for transcriptional activation, shed some light into this additional role of nitrate. NirA^{c1} constitutively localizes to the nucleus and occupies the crucial NirA binding site 2, leading to partial constitutivity of *niiA* and *nirD* expression and complete constitutivity of all of the chromatin rearrangements extant in the *niiA-nirD* bidirectional promoter. With the exception of nuclear localization, all of these phenotypes are dependent on the GATA factor AreA. This is in line with previous work which revealed a synergy of AreA and NirA in eliciting transcription and strongly suggested an *in vivo* interaction between these two proteins (5, 16, 33–35). Particularly challenging is the observation that complete chromatin remodeling in the intergenic region occurs in *nirA*^{c1} strains in the absence of nitrate because previous work has shown that gross chromatin remodeling determined by MNase is independent of NirA (33). However, recent results (5) suggest that NirA has a role in the kinetics of loss-of-positioning of nucleosome –1. The *nirA*^{c1} mutation, besides disrupting the interaction of NirA with the nuclear export machinery, must also result in interactions with the transcriptional and chromatin restructuring machinery in the absence of nitrate. The *nirA*^{c1} mutation maps in the NES and exchanges a neutral amino acid (glycine) for a hydrophobic residue (valine) in a region proposed to form hydrophobic interactions with the nuclear export machinery. The G167V substitution may lead to a densely packed hydrophobic pocket restricting the access of KapK. Substitutions in the canonical leucines of the NES by alanines, which result in nuclear retention, result also in *nirA* loss-of-function phenotypes, which implies a role of this region for the protein to be active as a transcriptional activator. The molecular basis of nitrate-mediated inhibition of NirA export remains unknown. Posttranslational modification of proteins such as phosphorylation (14, 25, 39, 65, 67) or as shown for Yap1p (see the introduction), through the formation of an intramolecular disulfide bridge, could mask (or unmask) an NES (12, 64). It is tempting to speculate that the NirA NES is involved in intramolecular interactions with the NirA activation domain and that nitrate or the *nirA*^{c1} mutation acts by disrupting these interactions, making the transcriptional activation domain accessible while masking the NES. If this were the case, it should be possible to isolate additional constitutive, gain-of-function mutations mapping in these proposed interaction domains. Studies that support this view are under way. Additional constitutive mutations and suppressor mutations of thermosensitive *nirA* mutations have been identified in the central region and the C terminus of NirA (Andreas Bernreiter, Lisa Olsson, Herb N. Arst, Jr., and Joseph Strauss, unpublished results).

ACKNOWLEDGMENTS

Work at Vienna was supported by the Austrian Science Fund FWF grants START-Y114 and P-17018 to J.S. Work at Orsay was supported by the Université Paris-Sud, CNRS, the Institut Universitaire de France, and EC contract PL-96-0535. A.R. was partially supported by the above-mentioned contract and a studentship of the Fondation de la Recherche Médicale. Work at Madrid was supported by Ministerio de Educación y Ciencia grant BMC2003-00874 to E.A.E., and J.F.-M. and L.A.-B. held PFPI and FPU positions, respectively.

We thank Steve Osmani for plasmids and Berl Oakley for $\Delta nkuA$ strains.

REFERENCES

- Adachi, Y., and M. Yanagida. 1989. Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115-kDa protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J. Cell Biol.* **108**:1195–1207.
- Andrianopoulos, A., S. Kourambas, J. A. Sharp, M. A. Davis, and M. J. Hynes. 1998. Characterization of the *Aspergillus nidulans nmrA* gene involved in nitrogen metabolite repression. *J. Bacteriol.* **180**:1973–1977.
- Arst, H. N., Jr., and D. J. Cove. 1973. Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **126**:111–141.
- Axelrod, J. D., J. Majors, and M. C. Brandriss. 1991. Proline-independent binding of PUT3 transcriptional activator protein detected by footprinting in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **11**:564–567.
- Berger, H., R. Pachlinger, I. Morozov, S. Goller, F. Narendja, M. Caddick, and J. Strauss. 2006. The GATA factor *AreA* regulates localization and in vivo binding site occupancy of the nitrate activator NirA. *Mol. Microbiol.* **59**:433–446.
- Bogerd, H. P., R. A. Fridell, S. Madore, and B. R. Cullen. 1995. Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell* **82**:485–494.
- Brisco, P. R., and G. B. Kohlhaw. 1990. Regulation of yeast LEU2: total deletion of regulatory gene LEU3 unmasks GCN4-dependent basal level expression of LEU2. *J. Biol. Chem.* **265**:11667–11675.
- Burger, G., J. Strauss, C. Scazzocchio, and B. F. Lang. 1991. *nirA*, the pathway-specific regulatory gene of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*, encodes a putative GAL4-type zinc finger protein and contains four introns in highly conserved regions. *Mol. Cell. Biol.* **11**:5746–5755.
- Clutterbuck, A. J., and H. Arst. 1995. Genetic nomenclature guide. *Aspergillus nidulans*. *Trends Genet.* **13**:14.
- Cove, D. J. 1979. Genetic studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **54**:291–327.
- Daboussi, M. J., T. Langin, F. Deschamps, Y. Brygoo, C. Scazzocchio, and G. Burger. 1991. Heterologous expression of the *Aspergillus nidulans* regulatory gene *nirA* in *Fusarium oxysporum*. *Gene* **109**:155–160.
- Delaunay, A., A. D. Isnard, and M. B. Toledano. 2000. H2O2 sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J.* **19**:5157–5166.
- De Souza, C. P., A. H. Osmani, S. B. Hashmi, and S. A. Osmani. 2004. Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* **14**:1973–1984.
- Dominguez, D., B. Montserrat-Sentis, A. Virgos-Soler, S. Guaita, J. Grueso, M. Porta, I. Puig, J. Baulida, C. Franci, and A. Garcia de Herrerios. 2003. Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.* **23**:5078–5089.
- Farjot, G., A. Sergeant, and I. Mikaelian. 1999. A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and CRM-1. *J. Biol. Chem.* **274**:17309–17317.
- Feng, B., and G. A. Marzluf. 1998. Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **18**:3983–3990.
- Floer, M., and G. Blobel. 1999. Putative reaction intermediates in Crm1-mediated nuclear protein export. *J. Biol. Chem.* **274**:16279–16286.
- Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida, and I. W. Mattaj. 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90**:1051–1060.
- Fritz, C. C., M. L. Zapp, and M. R. Green. 1995. A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature* **376**:530–533.
- Gietz, R. D., B. Triggs-Raine, A. Robbins, K. C. Graham, and R. A. Woods. 1997. Identification of proteins that interact with a protein of interest: applications of the yeast two-hybrid system. *Mol. Cell. Biochem.* **172**:67–79.
- Gomez, D., B. Cubero, G. Cecchetto, and C. Scazzocchio. 2002. PrnA, a Zn2Cys6 activator with a unique DNA recognition mode, requires inducer for in vivo binding. *Mol. Microbiol.* **44**:585–597.
- Guan, T., R. H. Kehlenbach, E. C. Schirmer, A. Kehlenbach, F. Fan, B. E. Clurman, N. Arnheim, and L. Gerace. 2000. Nup50, a nucleoplasmically oriented nucleoporin with a role in nuclear protein export. *Mol. Cell. Biol.* **20**:5619–5630.
- Hon, T., A. Hach, H. C. Lee, T. Cheng, and L. Zhang. 2000. Functional analysis of heme regulatory elements of the transcriptional activator Hap1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**:584–591.
- Hon, T., H. C. Lee, A. Hach, J. L. Johnson, E. A. Craig, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and L. Zhang. 2001. The Hsp70-Ydj1 molecular chaperone represses the activity of the heme activator protein Hap1 in the absence of heme. *Mol. Cell. Biol.* **21**:7923–7932.
- Ishida, N., T. Hara, T. Kamura, M. Yoshida, K. Nakayama, and K. I. Nakayama. 2002. Phosphorylation of p27^{Kip1} on serine 10 is required for its binding to CRM1 and nuclear export. *J. Biol. Chem.* **277**:14355–14358.
- Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, and S. Horinouchi. 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:9112–9117.
- Lee, H. C., T. Hon, and L. Zhang. 2002. The molecular chaperone Hsp90 mediates heme activation of the yeast transcriptional activator Hap1. *J. Biol. Chem.* **277**:7430–7437.
- Leuther, K. K., and S. A. Johnston. 1992. Nondissociation of GAL4 and GAL80 in vivo after galactose induction. *Science* **256**:1333–1335.
- Leuther, K. K., J. M. Salmeron, and S. A. Johnston. 1993. Genetic evidence that an activation domain of GAL4 does not require acidity and may form a beta sheet. *Cell* **72**:575–585.
- Malardier, L., M. J. Daboussi, J. Julien, F. Roussel, C. Scazzocchio, and Y. Brygoo. 1989. Cloning of the nitrate reductase gene (*nirA*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* **78**:147–156.
- Marzluf, G. A. 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:17–32.
- Morozov, I. Y., M. Galbis-Martinez, M. G. Jones, and M. X. Caddick. 2001. Characterization of nitrogen metabolite signalling in *Aspergillus* via the regulated degradation of *areA* mRNA. *Mol. Microbiol.* **42**:269–277.
- Muro-Pastor, M. I., R. Gonzalez, J. Strauss, F. Narendja, and C. Scazzocchio. 1999. The GATA factor *AreA* is essential for chromatin remodeling in a eukaryotic bidirectional promoter. *EMBO J.* **18**:1584–1597. (Erratum, **18**:2670.)
- Muro-Pastor, M. I., J. Strauss, A. Ramon, and C. Scazzocchio. 2004. A paradoxical mutant GATA factor. *Eukaryot. Cell* **3**:393–405.
- Narendja, F., S. P. Goller, M. Wolschek, and J. Strauss. 2002. Nitrate and the GATA factor *AreA* are necessary for in vivo binding of NirA, the pathway-specific transcriptional activator of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **44**:573–583.
- Nayak, T., E. Szweczyk, C. E. Oakley, A. Osmani, L. Ukil, S. L. Murray, M. J. Hynes, S. A. Osmani, and B. R. Oakley. 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**:1557–1566.
- Neville, M., and M. Rosbash. 1999. The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **18**:3746–3756.
- Neville, M., F. Stutz, L. Lee, L. I. Davis, and M. Rosbash. 1997. The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr. Biol.* **7**:767–775.
- Okamura, H., J. Aramburu, C. Garcia-Rodriguez, J. P. Viola, A. Raghavan, M. Tahiliani, X. Zhang, J. Qin, P. G. Hogan, and A. Rao. 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell* **6**:539–550.
- Orlando, V., H. Strutt, and R. Paro. 1997. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**:205–214.
- Pachlinger, R., R. Mitterbauer, G. Adam, and J. Strauss. 2005. Metabolically independent and accurately adjustable *Aspergillus* sp. expression system. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:672–678.
- Pateman, J. A., and D. J. Cove. 1967. Regulation of nitrate reduction in *Aspergillus nidulans*. *Nature* **215**:1234–1237.
- Pemberton, L. F., and B. M. Paschal. 2005. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* **6**:187–198.
- Pokorska, A., C. Drevet, and C. Scazzocchio. 2000. The analysis of the transcriptional activator PrnA reveals a tripartite nuclear localization sequence. *J. Mol. Biol.* **298**:585–596.
- Punt, P. J., M. A. Dingemanse, A. Kuyvenhoven, R. D. Soede, P. H. Pouwels, and C. A. van den Hondel. 1990. Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* **93**:101–109.
- Punt, P. J., J. Strauss, R. Smit, J. R. Kinghorn, C. A. van den Hondel, and C. Scazzocchio. 1995. The intergenic region between the divergently transcribed *nirA* and *nirD* genes of *Aspergillus nidulans* contains multiple NirA binding sites which act bidirectionally. *Mol. Cell. Biol.* **15**:5688–5699.
- Rand, K. N., and H. N. Arst, Jr. 1978. Mutations in *nirA* gene of *Aspergillus nidulans* and nitrogen metabolism. *Nature* **272**:732–734.
- Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter. 1990. Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Ryan, K. J., and S. R. Went. 2000. The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:361–371.
- Scazzocchio, C. 2000. The fungal GATA factors. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:126–131.
- Selleck, S. B., and J. E. Majors. 1987. In vivo DNA-binding properties of a yeast transcription activator protein. *Mol. Cell. Biol.* **7**:3260–3267.
- Serebriiskii, I. G., and E. A. Golemis. 2001. Two-hybrid system and false positives: approaches to detection and elimination. *Methods Mol. Biol.* **177**:123–134.
- Stade, K., C. S. Ford, C. Guthrie, and K. Weis. 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**:1041–1050.
- Stoffler, D., B. Fahrenkrog, and U. Aebi. 1999. The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:391–401.

55. Strauss, J., M. I. Muro-Pastor, and C. Scazzocchio. 1998. The regulator of nitrate assimilation in ascomycetes is a dimer which binds a nonrepeated, asymmetrical sequence. *Mol. Cell. Biol.* **18**:1339–1348.
56. Tilburn, J., C. Scazzocchio, G. G. Taylor, J. H. Zabicky-Zissman, R. A. Lockington, and R. W. Davies. 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**:205–221.
57. Todd, R. B., J. A. Fraser, K. H. Wong, M. A. Davis, and M. J. Hynes. 2005. Nuclear accumulation of the GATA factor AreA in response to complete nitrogen starvation by regulation of nuclear export. *Eukaryot. Cell* **4**:1646–1653.
58. Tollervey, D., and H. N. Arst, Jr. 1981. Mutations to constitutivity and derepression are separate and separable in a regulatory gene of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **4**:63–68.
59. Unkles, S. E., K. L. Hawker, C. Grieve, E. I. Campbell, P. Montague, and J. R. Kinghorn. 1991. crnA encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:204–208. (Errata, **88**:4564, 1991, and **92**:3076, 1995.)
60. Unkles, S. E., D. Zhou, M. Y. Siddiqi, J. R. Kinghorn, and A. D. Glass. 2001. Apparent genetic redundancy facilitates ecological plasticity for nitrate transport. *EMBO J.* **20**:6246–6255.
61. Wang, R., M. Okamoto, X. Xing, and N. M. Crawford. 2003. Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* Roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant Physiol.* **132**:556–567.
62. Whitehead, M. P., S. J. Gurr, C. Grieve, S. E. Unkles, D. Spence, M. Ramsden, and J. R. Kinghorn. 1990. Homologous transformation of *Cephalosporium acremonium* with the nitrate reductase-encoding gene (*niaD*). *Gene* **90**:193–198.
63. Wolschek, M. F., F. Narendja, J. Karlseder, C. P. Kubicek, C. Scazzocchio, and J. Strauss. 1998. In situ detection of protein-DNA interactions in filamentous fungi by in vivo footprinting. *Nucleic Acids Res.* **26**:3862–3864.
64. Wood, M. J., G. Storz, and N. Tjandra. 2004. Structural basis for redox regulation of Yap1 transcription factor localization. *Nature* **430**:917–921.
65. Yagita, K., S. Yamaguchi, F. Tamanini, G. T. van Der Horst, J. H. Hoeijmakers, A. Yasui, J. J. Loros, J. C. Dunlap, and H. Okamura. 2000. Dimerization and nuclear entry of mPER proteins in mammalian cells. *Genes Dev.* **14**:1353–1363.
66. Yang, L., L. Ukil, A. Osmani, F. Nahm, J. Davies, C. P. De Souza, X. Dou, A. Perez-Balaguer, and S. A. Osmani. 2004. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* **3**:1359–1362.
67. Zhang, Y., and Y. Xiong. 2001. A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* **292**:1910–1915.
68. Zhu, J., R. J. Hill, P. J. Heid, M. Fukuyama, A. Sugimoto, J. R. Priess, and J. H. Rothman. 1997. *end-1* encodes an apparent GATA factor that specifies the endoderm precursor in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Genes Dev.* **11**:2883–2896.

Aspergillus nidulans VeA subcellular localization is dependent on the importin α carrier and on light

Suzanne M. Stinnett,^{1†} Eduardo A. Espeso,^{2†}
Laura Cobeño,² Lidia Araújo-Bazán² and
Ana M. Calvo^{1*}

¹Northern Illinois University, Biological Sciences,
1425 W. Lincoln Hwy Montgomery Hall, DeKalb, IL
60115, USA.

²Centro de Investigaciones Biológicas (C.S.I.C.),
Microbiología Molecular, Ramiro de Maeztu, 9. 28040
Madrid, Spain.

Summary

The *veA* gene is a light-dependent regulator governing development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*. We have identified a putative bipartite nuclear localization signal (NLS) motif in the *A. nidulans* VeA amino acid sequence and demonstrated its functionality when expressed in yeast. Furthermore, migration of VeA to the nucleus was dependent on the importin α . This bipartite NLS is also functional when VeA is expressed in *A. nidulans*. Interestingly, we found that VeA migration to the nucleus is light-dependent. While in the dark VeA is located mainly in the nuclei, under light VeA is found abundantly in the cytoplasm. The VeA1 mutant protein (lacking the first 36 amino acids at the N-terminus) was found predominantly in the cytoplasm independent of illumination. This indicates that the truncated bipartite NLS in VeA1 is not functional and fails to respond to light. These results might explain the lack of the morphological light-dependent response in strains carrying the *veA1* allele. We also evaluated the effect of light on production of the mycotoxin sterigmatocystin in a *veA* wild-type and the *veA1* mutant strains and found that the highest amount of toxin was produced by the *veA*⁺ strain growing in the dark, condition favouring accumulation of VeA in the nucleus.

Introduction

Most *Aspergillus* species disseminate efficiently by generating asexual spores called conidia. Other species,

including the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, also produce sexual spores called ascospores during their life cycle. Conidia are formed on specialized structures called conidiophores while ascospores are formed in sexual fruiting bodies denominated cleistothecia. Conidiophore formation is initiated from a thick-walled foot cell forming a stalk. The tip of the stalk forms a vesicle where elongated cells called sterigmata develop. From the sterigmata, long chains of airborne conidia are produced. During *A. nidulans* sexual stage, vegetative hyphae coil and fuse forming the cleistothecium. Large thick-walled cells called Hülle cells nurse the cleistothecial primordia contributing to the formation of the cleistothecium wall. Reproductive ascogenous hyphae proliferate generating ascospore-containing asci within the cleistothecia (Alexopoulos, 1962; Yager, 1992; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Aspergillus and other fungi are able to sense extracellular factors that are integrated by regulatory networks influencing a developmental adaptive response. This response balances vegetative growth and both asexual and sexual development (Adams and Yu, 1998; Calvo *et al.*, 2001; 2002; Braus *et al.*, 2002; Tsitsigiannis *et al.*, 2004a). In *A. nidulans*, environmental factors such as light, pH, oxidative metabolism and nutritional factors direct morphogenesis towards asexual or sexual development (Clutterbuck, 1977; Mooney and Yager, 1990; Mooney *et al.*, 1990; Skromne *et al.*, 1995; Adams and Yu, 1998; Peñalva and Arst, 2004). Among these environmental factors, light has a major effect on *A. nidulans* morphological development triggering asexual differentiation, whereas in the absence of light the fungus differentiates forming sexual fruiting bodies (Yager, 1992; Champe *et al.*, 1994). In this fungus the *velvet* gene, *veA*, is a global regulator that mediates this developmental response to light (Yager, 1992). The *veA* deletion in *A. nidulans* blocks the formation of cleistothecia (Kim *et al.*, 2002) while conidial production is increased (Kim *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2003). In addition, strains carrying a *veA1* mutant allele have been, and are, extensively used in the *Aspergillus* research. The *veA1* allele has a point mutation in the first ATG and consequently the first methionine in the VeA1 protein corresponds to M37 of the wild type. The *veA1* genetic background causes loss of VeA light-dependent response, resulting in increased conidiation under light and dark growth conditions, and

Accepted 30 October, 2006. *For correspondence. E-mail amcalvo@niu.edu; Tel. (+1) 815 753 0451; Fax (+1) 815 753 0461. †Both authors made equal contributions to this work.

presenting a delayed and reduced sexual development. This fact suggests that the N-terminal region of the VeA protein is vital for the *A. nidulans* light-regulated morphogenesis. The VeA N-terminal region contains two putative nuclear localization signal (NLS) motifs. One of them, a predicted pat7 motif, was indicated by Kim *et al.* (2002) from amino acid K41 to C46 of the deduced amino acid VeA sequence. The functionality of this putative pat7 motif has not been investigated. In this report we present a second NSL motif, a predicted bipartite NLS that extends from K28 to R44 amino acids (partially overlapping pat7). We were particularly interested in this putative bipartite NLS as, based on the information described above, the 'blind-to-light' VeA1 protein would present a truncation of this bipartite NLS motif.

In addition to the role of *veA* in morphogenesis, we have previously described *veA* to be essential for normal production of mycotoxin and other secondary metabolites (Kato *et al.*, 2003; Calvo *et al.*, 2004; Duran *et al.*, 2006). The possible connection between VeA subcellular localization and mycotoxin production has not been investigated until now.

Here we report a novel study on the subcellular localization of VeA and its response to light in *A. nidulans*. We found a similar bipartite NLS conserved in other *Aspergillus* spp., including the human pathogen *Aspergillus fumigatus* and the aflatoxin producers *Aspergillus parasiticus* and *A. flavus*. Therefore, the implications of this study in the model fungus could extend to other fungal species, contributing to a better understanding of the light-sensing mechanisms as well as of the mechanisms that are part of the adaptive response to this stimulus.

Results

Aspergillus nidulans VeA has a putative classical bipartite NLS motif also present in other *Aspergillus* spp.

We found in VeA a conserved bipartite NLS-like motif, related to that described at the SV40 large tumour antigen or nucleoplasmic NLSs. Although similar, the VeA NLS does not completely fit in with the consensus established by Fontes *et al.* (2000; 2003a) for bipartite NLSs. This putative NLS is located at the N-terminal of the VeA-deduced amino acid sequence. We analysed for the presence of VeA and conservation of this putative bipartite NLS in *Aspergillus* spp. and across fungal genera (Fig. 1). We found that VeA was not found in strictly yeast organisms such as *Saccharomyces cerevisiae* or *Schizosaccharomyces pombe*. However, VeA was found in filamentous fungi other than *Aspergilli*, for example in *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe grisea* or the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum* (K. Myung, M.R.

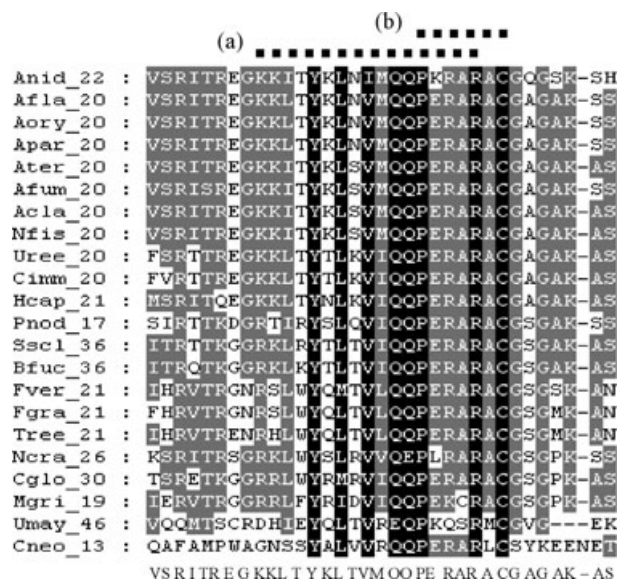


Fig. 1. Amino acid sequence alignment of a portion of VeA N-terminal regions from different fungi. The putative nuclear localization signal in *Aspergillus nidulans* (a) bipartite NLS and (b) pat7 are indicated by the broken lines. A consensus sequence is shown under the alignment. Black shadows represent 100% conservation and grey shadows represent 60% conservation. The number following the fungal names corresponds to the amino acid number in each VeA sequence. Anid, *A. nidulans*; Afla, *A. flavus*; Aory, *A. oryzae*; Apar, *A. parasiticus*; Ater, *A. terreus*; Afum, *A. fumigatus*; Acla, *A. clavatus*; Nfis, *Neosartorya fischeri*; Uree, *Uncinocarpus reesii*; Cimm, *Coccidioides immitis*; Hcap, *Histoplasma capsulatum*; Pnod, *Phaeosphaeria nodorum*; Sscl, *Sclerotinia sclerotiorum*; Btuc, *Botryotinia fuckeliana*; Fver, *Fusarium verticillioides*; Fgra, *Fusarium graminearum*; Tree, *Trichoderma reesei*; Ncra, *Neurospora crassa*; Cglo, *Chaetomium globosum*; Mgr1, *Magnaporthe grisea*. Umay, *Ustilago maydis*; Cneo, *Cryptococcus neoformans*.

Duval and A.M. Calvo, unpublished). A similar bipartite NLS was found in all the *Aspergillus* VeA sequences analysed (Fig. 1): *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. clavatus* along with *A. nidulans*. This bipartite NLS seems exclusive of *Aspergillus* spp. as when VeA from other fungal genera were analysed the bipartite motif was not found (with the exception of *H. capsulatum*, *Neosartorya fischeri*, *Uncinocarpus reesii* and *Coccidioides immitis*).

Aspergillus nidulans VeA NLS is functional

To test whether this NLS is functional we first generated a series of constructs containing different alleles of *A. nidulans* *veA* (*veA*, Δ NLS*veA* and *veA1*) fused to the gene encoding the green fluorescent protein (*gfp*) as indicated in the diagram in Fig. 2A. Additional constructs with the monopartite SV40 large T antigen NLS to these fusion proteins were included as internal controls for nuclear localization. The constructs were introduced in *S. cerevisiae* (*S. cerevisiae* does not have an endog-

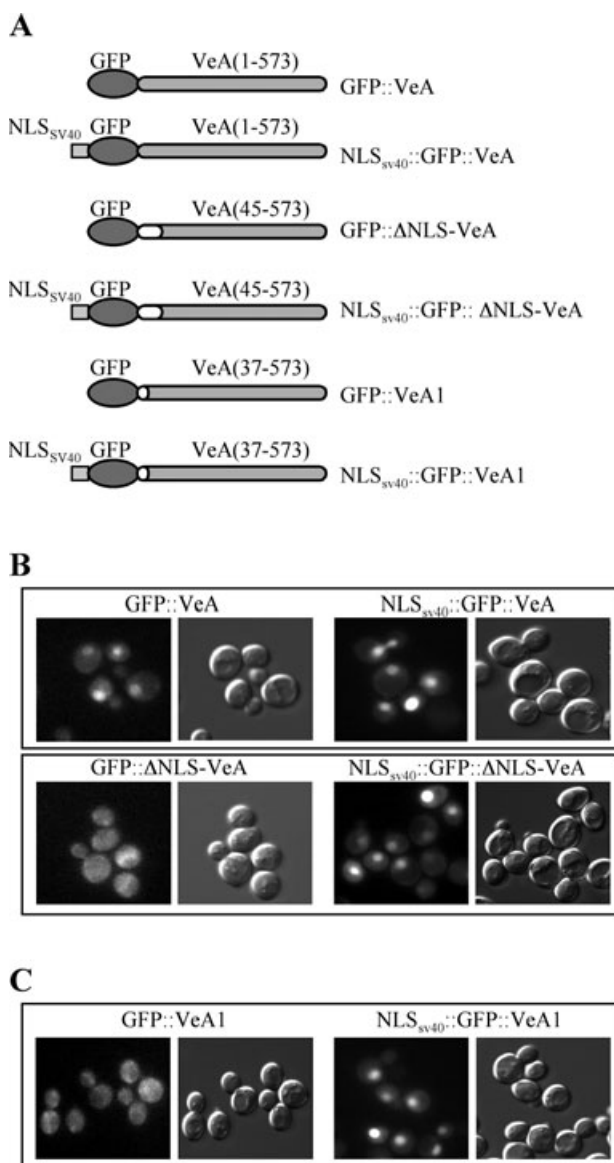


Fig. 2. Wild-type VeA was found in the nucleus, while Δ NLS-VeA and VeA1 proteins were found in the cytoplasm.

A. Representation of constructs with GFP fused to different *A. nidulans* VeA protein forms: wild-type VeA, Δ NLS-VeA and VeA1. Positive controls containing the NLS_{SV40} were also generated for each protein form.

B. and C. Micrographs showing the subcellular localization of the fusions described in (A) when expressed in *S. cerevisiae* cells. B. GFP::VeA.C.GFP::VeA1. On the left green fluorescence images and on the right Normaski images are shown. In each case, constructs with the additional NLS_{SV40} were used in parallel as nuclear localization internal controls.

enous VeA, see previous section) using centromeric plasmids, obtaining strains expressing: GFP::VeA; NLS_{SV40}::GFP::VeA; GFP:: Δ NLS-VeA; NLS_{SV40}::GFP:: Δ NLS-VeA; GFP::VeA1; and NLS_{SV40}::GFP::VeA1. Figure 2B shows that VeA was found accumulating mainly in the nuclei, while the Δ NLS-VeA was distributed equally

between nucleus and cytoplasm, as occurs for GFP single constructs (not shown). These results indicate that VeA has a functional NLS at the N-terminus and is recognized by the yeast nuclear import machinery. Interestingly, the GFP::VeA1 chimera showed cytoplasmic localization (Fig. 2C), contrasting with the positive control NLS_{SV40}::GFP::VeA1 that located to the nucleus, as expected (under identical experimental conditions). These results strongly indicate that the first 36 amino acids missing in VeA1 mutant protein are crucial for VeA localization to the nucleus. Therefore, the truncated bipartite NLS and the pat7 putative NLS present in VeA1 (described by Kim *et al.*, 2002) are not sufficient for effective transport to the nucleus of yeast cells. This result is relevant as most laboratories using *A. nidulans* as a model organism utilize the *veA1* mutation to induce conidiation in the dark, despite the lack of knowledge over molecular mechanism(s) altered in the *veA1* mutant background.

VeA migration to the nucleus is dependent on the importin α carrier protein Srp1p/KapA

The data shown above support the hypothesis that VeA contains a classical bipartite NLS that could be specifically recognized by the general nuclear transporter importin α . The importin α homologue to Srp1p was found in *A. nidulans* and denominated KapA (AF465210; J. Fernandez-Martinez and E.A. Espeso, unpublished; Fernandez-Martinez *et al.*, 2003). There are no importin α mutants currently available in *A. nidulans*. We used then the *S. cerevisiae* thermosensitive *srp1-31* importin α mutant allele to investigate whether VeA transport to the nucleus was dependent on this protein carrier. Our results showed that the preferential VeA nuclear localization was indeed dependent on the activity of the importin α (Fig. 3A). At the permissive temperature (25°C) for the mutated form *srp1-31p* VeA was efficiently transported to the nucleus, while at restrictive temperature (37°C), at which *srp1-31p* is inactive, VeA nuclear localization was lost. Expression of GFP::VeA in wild-type yeast cells resulted in VeA nuclear localization also at 37°C.

We analysed the importin α recognition of *A. nidulans* VeA NLS by using the two-hybrid system (Fig. 3B). Several VeA forms were analysed as baits: 1–573 (wild-type) and truncated forms 45–573 (Δ NLS-VeA), 186–573 and 37–573 (VeA1). Our results indicated that the 1–573 wild-type efficiently interacts with KapA, while Δ NLS-VeA and VeA1 showed a weak interaction with KapA. The way in which the wild-type VeA form interacts with KapA and the fact that Δ NLS-VeA and VeA1 presented only a weak interaction is in agreement with our microscopic observation described above and evidences the bipartite nature of the NLS, as VeA1 lacks half of the signal. We then analysed *in vitro* the previously detected interaction between

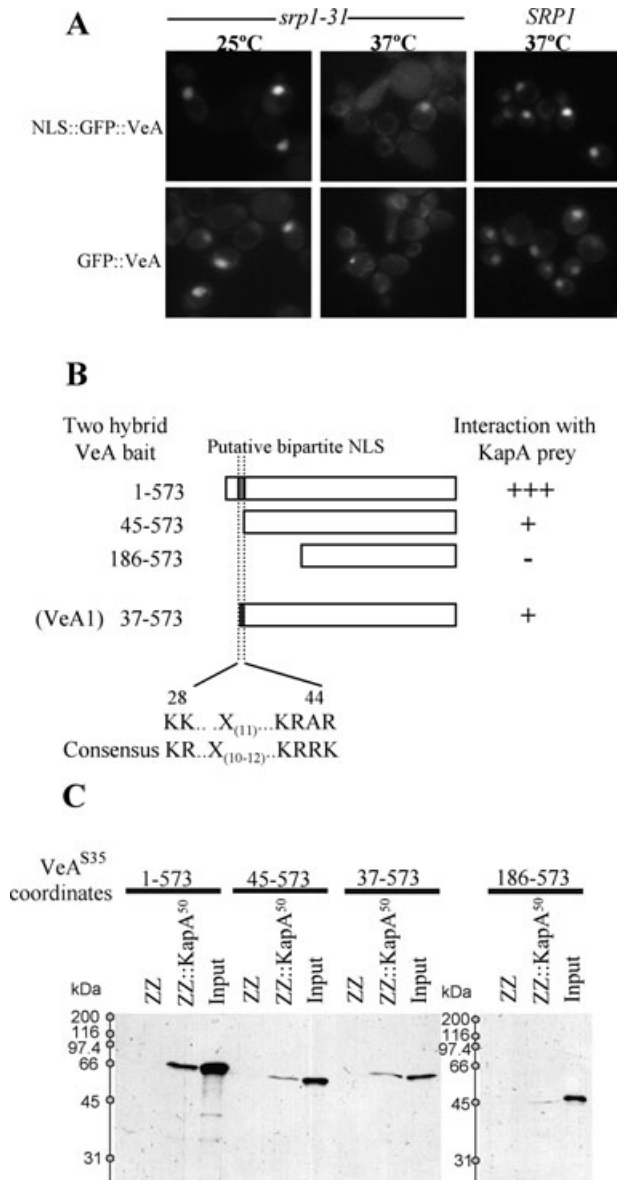


Fig. 3. Importin α recognizes the *A. nidulans* VeA bipartite NLS. **A.** Nuclear localization phenotype of the GFP-tagged VeA in a *S. cerevisiae* strain carrying a thermosensitive mutation (*srp1-31*) in the single yeast importin α gene. The experiment was performed at permissive temperature (25°C) and restrictive temperature (37°C) for the *srp1-31* mutant protein form. **B.** Two-hybrid analysis using the indicated bait and prey proteins showing that VeA protein interacts with the *A. nidulans* importin α . Deletion NLS VeA and VeA1 protein forms lost most of this interaction. The consensus bipartite NLS is shown. **C.** *In vitro* interaction analysis between KapA and different truncated forms of VeA. Input corresponds to one-fifth of the S³⁵-labelled *velvet* form used in each experiment. Lanes marked as ZZ and ZZ::KapA⁵⁰ contain IgG-sepharose loaded with either ZZ protein tag or ZZ::KapA⁵⁰ respectively. Importin α is able to interact with proteins containing the putative bipartite NLS or residues between co-ordinates 37–186.

N-terminus region of *velvet* and the importin α . In agreement with the preceding results, KapA⁵⁰ (the truncated version lacking the auto-inhibitory domain) interacted with the wild-type VeA protein and showed a slightly weaker interaction with proteins having the region between residues 37 and 186 (Fig. 3C, and confirmation by densitometry, data not shown). These results suggest that the region comprising residues 37–186 might participate in the KapA nuclear-mediated transport of *velvet* and that *in vivo* the bipartite NLS might be post-transcriptionally modified to improve binding to the nuclear carrier.

No classical consensus export signals (NES) were found in the VeA sequence. Furthermore, we tested the possible interaction of VeA with the exportin 1 KapK (Accession No. AY555733, Bernreiter *et al.*, 2006), the *A. nidulans* CRM1p orthologue (Kutay and Güttinger, 2005), by the two-hybrid assay. The results indicated no interaction between these two proteins (data not shown).

VeA is also found in the nucleus when expressed in A. nidulans

In order to express VeA fused to GFP in *A. nidulans*, we generated a *veA::gfp* construct by a three-way PCR-based 3' tagging protocol (described in *Experimental procedures*). This construct was inserted in the *A. nidulans* *veA* locus as illustrated in Fig. 4A, where *veA* expression is governed by its own promoter. The correct integrations were confirmed by PCR and Southern blot analysis (not shown). The cultures were incubated overnight in the dark. In Fig. 4B we show that VeA is found into the nuclei in *A. nidulans* as indicated by the nucleus-specific 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining.

A similar strategy was used to express the VeA1::GFP fusion (Fig. 4C). In contrast to the wild-type VeA, the truncated VeA1 protein was found in the cytoplasm (Fig. 4D), associated in part with elongated structures. When treated with benomyl the elongated structures remained (data not shown), suggesting that these structures are not part of the cell tubulin cytoskeleton. Further investigation is needed to elucidate the nature of these structures and whether they are associated with the light-sensing apparatus in *A. nidulans*.

Additionally we performed Western analysis using antibodies against GFP to visualize the VeA–GFP-tagged versions, detecting a 90 kDa band in both *veA+* and *veA1* backgrounds as a result of the fusion between *velvet* and GFP evidencing that the VeA1::GFP truncated allele was being expressed in *Aspergillus* (Fig. S1). Wild-type VeA was previously detected by Western blot by Toews *et al.* (2004).

All the transformants expressing the VeA::GFP chimera showed wild-type phenotype in their light-dependent morphological development (Fig. S2) and also regarding the

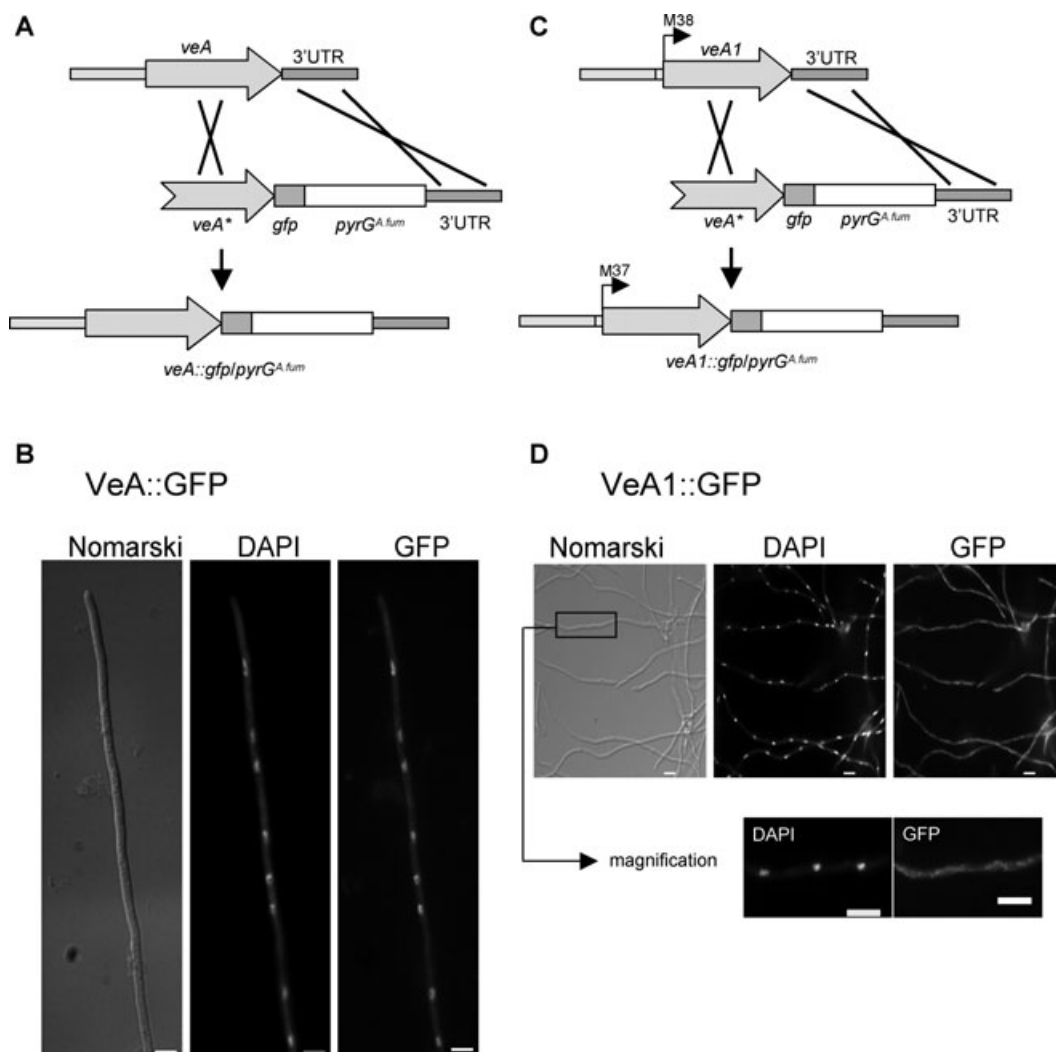


Fig. 4. Wild-type VeA is able to locate at the nuclei while VeA1 mutant protein fails to efficiently accumulate at the nuclei of *A. nidulans* cells. A and C. Representation of the strategy followed to fuse GFP to *A. nidulans* VeA and VeA1 respectively. The transformation cassette was generated by the three-way PCR-based 3' GFP tagging protocol described by Yang *et al.* (2004). The tagged construct was introduced at the *veA* locus of a *veA* wild type or a *veA1* strain by a double-recombination event. B. From left to right: Normaski, DAPI and green fluorescence images are shown. Bar shown at the bottom of the images represents 5 µm. D. From left to right: Normaski, DAPI and green fluorescence images from a strain carrying the *VeA1::GFP* fusion are shown. A magnified detail of hypha is also included. A micrograph detail of hypha from a strain containing the *VeA::GFP* fusion is shown for comparison purposes. Bar at the bottom of each image represents 10 µm.

production of the mycotoxin sterigmatocystin (ST) (Fig. 5), indicating that the *VeA::GFP* fusion protein is functional. Although ST production still occurs in a *veA1* mutant background (i.e. Hicks *et al.*, 1997; Shimizu and Keller, 2001), the absence of *veA* results in a complete blockage in ST biosynthesis (Kato *et al.*, 2003). Using our *velvet*-GFP fused strains, we detected that the ST amount produced by the *veA1* mutant strain in the dark was similar to that of the *veA*⁺ wild-type strain under light growth conditions, and notably lower than the *veA*⁺ in the cultures grown in the absence of light. These results led us to examine whether the differential response to light in both morphogenesis and secondary metabolism was a con-

sequence of changes in VeA subcellular localization depending on this environmental factor.

VeA subcellular localization is light-dependent

veA is a light-dependent regulatory gene governing development and mycotoxin production in *A. nidulans* (Yager, 1992; Kim *et al.*, 2002; Kato *et al.*, 2003). Interestingly, our results showed the light-dependent subcellular localization of VeA (Fig. 6A and B). While in the dark VeA is located mainly into the nuclei, when grown in the presence of light VeA distributes between nucleoplasm and cytoplasm. Noticeably, the cytoplasmic

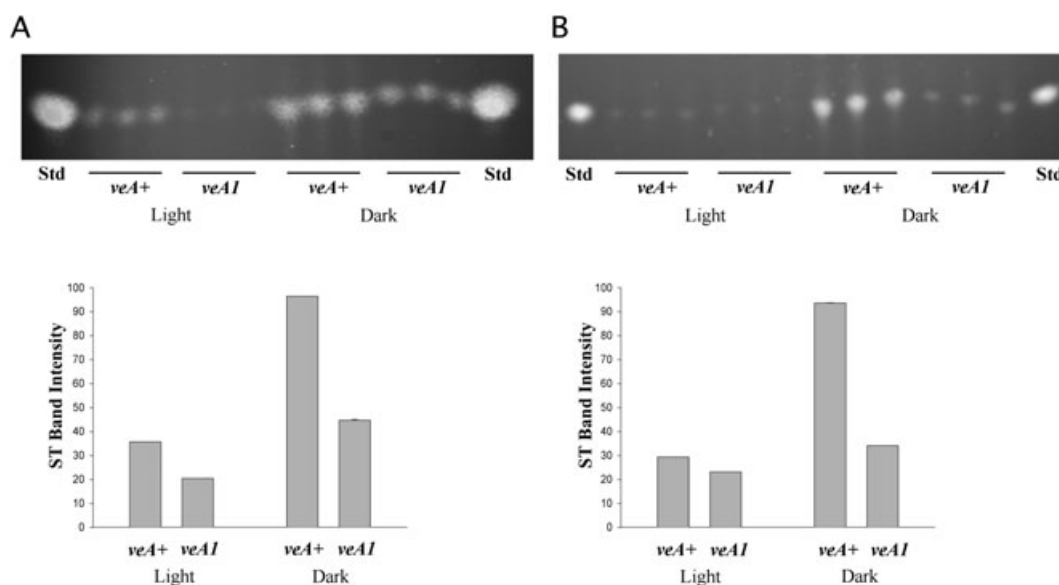


Fig. 5. Thin-layer chromatography analysis of ST production in *A. nidulans* *veA+* and *veA1* strains in light and dark cultures. The *veA* and *veA1* strains (A) and corresponding strains containing GFP fusions (B) were cultured on solid YGT for 7 days. The experiment included three replicates. Std., ST standard. The densitometry was carried out with the Scion Image Beta 4.03 software. The normalized ST band intensity values were normalized with respect to the highest intensity considered as 100.

VeA::GFP was also found associated with filamentous bodies, coinciding with areas highlighted by DAPI staining (Fig. 6C). A red-light phytochrome (FphA) is also associated to large particles in the cytoplasm in *A. nidulans* (Blumenstein *et al.*, 2005). In plants the phytochrome is associated with electrodense particles (McCurdy and Pratt, 1986). It is possible that VeA could be forming part of large protein complexes in the cytoplasm with the phytochrome in the light and associated with cell organelles.

Quantification of the fluorescence intensity (Wasabi Version 1.4, Hamamatsu Phototonics) supported our observations (Fig. 6B). In the dark, the nuclear/cytoplasmic fluorescence ratio was approximately 1.6, while in the light the ratio was approximately 1.1 (samples $n = 10$). Independent experiments were repeated three times obtaining similar results. The results from the quantification of fluorescence in the *VeA1::GFP* cultures were similar to those in *VeA::GFP* light cultures (data not shown).

In our study, *VeA1* showed cytoplasmic localization independently of light, indicating that the absence of the first 36 amino acids in the *VeA1* form causes a failure to respond to the light stimulus.

Differently from *A. nidulans*, in our experiments in yeast the nuclear localization of VeA was light-independent (data not shown). One possibility is that VeA is regulated negatively in the light in *A. nidulans* by an unknown molecule or complex, and that this molecule or complex has been lost in yeast, resulting in VeA nuclear localization in either light or dark.

Accumulation of VeA in the nucleus varies with changes in illumination regimen

In order to further understand the VeA subcellular localization in response to the presence or absence of light, we carried out shift experiments from light to dark and from dark to light. Our results showed that the intensity of the nuclear green fluorescence varied when the cultures were exposed to changes in illumination (Fig. 7), increasing when the culture was shifted from light to dark and decreasing when the culture was shifted from dark to light (the fluorescence intensity in the cytoplasm did not increase; data not shown). These results indicate that the VeA protein tends to accumulate in the nucleus when the fungus no longer has a light source. When dark cultures were exposed to light, the *VeA::GFP* protein nuclear levels decreased. A possible explanation to these observations is that VeA might be subjected to degradation in the presence of light.

Effect of blue light and red light on VeA subcellular localization

We tested the possible effects of blue light and red light on VeA subcellular localization. Our experiments showed that blue light had a similar effect to that observed with white light, preventing an efficient accumulation of *VeA::GFP* in the nuclei (Fig. 8). The effect of the exposure to red light was much moderated, still allowing protein accumulation in the nuclei, similarly to that observed in dark cultures (Fig. 8).

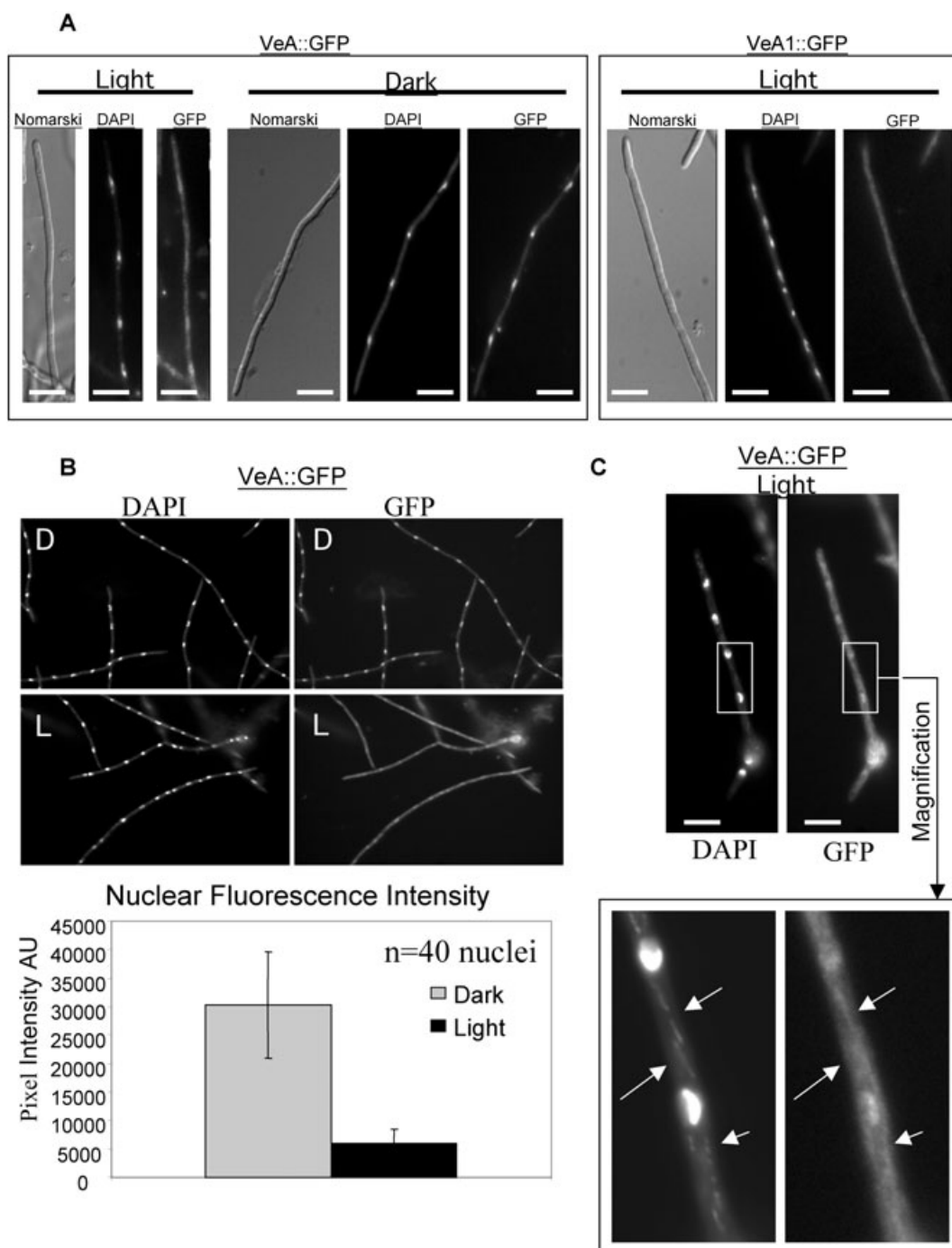


Fig. 6. VeA subcellular localization is light-dependent.

A. Cultures were exposed to light or kept in complete darkness. Images from a strain with the VeA1::GFP growing in the light under the same conditions are included for comparison purposes. From left to right: Normarski, DAPI and green fluorescence images are shown. Bar shown at the bottom of the images represents 10 μ m.

B. Quantification of nuclear fluorescence intensity (Wasabi Version 1.4, Hamamatsu Phototonics). L, light. D, dark.

C. Magnification ($\times 1000$) of VeA::GFP culture growing in the light. Arrows indicate higher cytoplasmic fluorescence from GFP and DAPI.

Discussion

In *A. nidulans* the *veA* gene regulates a balance between sexual and asexual development in response to light. In

the light the fungus develops forming conidiophores that bare airborne conidia while in the dark morphogenesis is directed to the formation of more resistant sexual fruiting bodies called cleistothecia. In spite of its importance, until

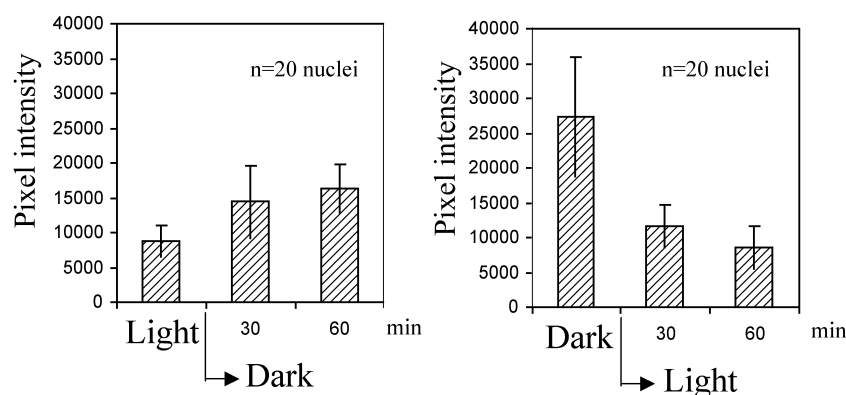


Fig. 7. Effect of illumination changes on the VeA::GFP subcellular localization. The strains were grown for 18 h in light or dark and then shifted from light to dark and vice versa. Samples were collected at the shift time and 30 and 60 min after the shift. Nuclear fluorescence was quantified with Wasabi Version 1.4 from Hamamatsu Phototonics.

now no previous reports have shown evidence of how VeA regulates development and how VeA integrates the light response.

We identified a putative bipartite NLS motif in the *A. nidulans* VeA-deduced amino acid sequence and demonstrated that this NLS is functional, indicating that VeA might exert its function into the nuclei, through interactions with other elements, protein and/or DNA. Furthermore, we have shown that the migration of VeA to the nucleus is dependent on the importin α , KapA, a carrier protein homologue to the *S. cerevisiae* Srp1p importin α protein, and demonstrated that this bipartite NLS, subject of our study, is necessary for normal interaction between VeA and KapA. In addition, our two-hybrid and *in vitro* results suggest the possibility of a post-transcriptional modification of VeA *in vivo* that could condition the interaction with KapA. Phosphorylation mechanisms have been described to influence the binding of NLS with the importin α (Fontes *et al.*, 2003b). We have found several consensus phosphorylation sites in the VeA amino acid sequence (A.M. Calvo, unpublished) and we are currently investigating whether VeA is phosphorylated in *A. nidulans*. In our study no evidence of VeA nuclear export was observed.

Not only did we find VeA conserved in other fungal species, even across fungal genera, we also found a similar bipartite NLS motif conserved among *Aspergillus* species, including important plant and human pathogens (Fig. 1), and industrially important fungi, suggesting that VeA could be part of an *Aspergillus*-specific light-response mechanism. The closely related *U. reesii* and pathogenic *N. fischeri*, *H. capsulatum* and *C. immitis* were an exception presenting a VeA protein with a similar NLS motif. The functionality of these NLSs in other *Aspergillus* species remains to be determined. NLSs have been experimentally determined for fewer than 10% of known nuclear proteins (Nair *et al.*, 2003) and therefore it is possible that these NLSs could also be functional. Interestingly, VeA was not found in fungi with a strictly yeast form.

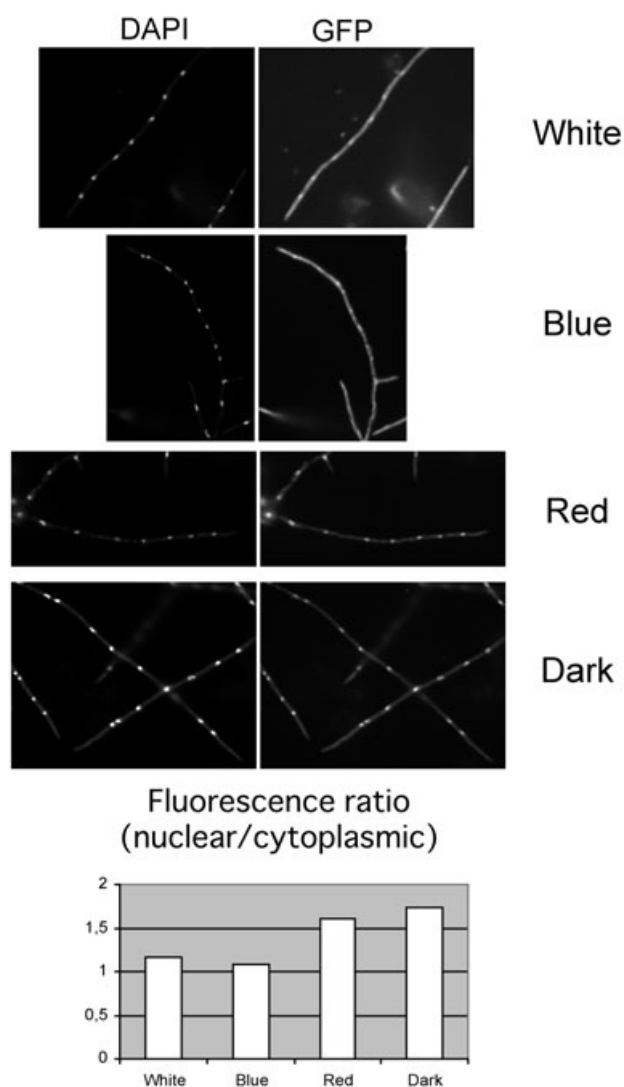


Fig. 8. Effect of different types of light on VeA::GFP subcellular localization. Cultures were grown for 25 h under while light, blue light, red light or in the dark. Fluorescence was quantified with Wasabi Version 1.4 from Hamamatsu Phototonics ($n = 10$).

It is also important to note that the VeA1-truncated protein form present in many strains used in the *Aspergillus* research community lacking part of the NLS shows reduced interaction with the importin α , and consequently, a deficient transport to the nucleus compared with the VeA wild-type protein. This finding strongly suggests that differences in VeA1 subcellular localization could account for the striking alteration of sexual/asexual ratio in *veA1* strain as well as metabolic differences compared with the *veA* wild-type strain.

Our results indicate that the subcellular localization of VeA depends on the presence or the absence of light. In the dark most of the VeA protein was found in the nuclei of fungal cells, while in the presence of light the level of VeA accumulation in the nucleus was lower compared with that observed in the dark. We also found this trend when the cultures were shifted from light to dark and from dark to light. Light cultures that were shifted to dark experienced an increase of VeA in the nuclei, while dark cultures exposed to light showed a reduction of this protein in the nucleus, without evidence of VeA nuclear export. Based on these observations it is possible that VeA protein degradation could be stimulated in the presence of light. This will possibly be the subject of future studies.

In a recent study a phytochrome denominated FphA that acts as a red-light sensor has been reported in *A. nidulans* (Blumenstein *et al.*, 2005). According to previous work, red light represses sexual development and induces conidiation in *A. nidulans* (Mooney and Yager, 1990; Blumenstein *et al.*, 2005; Idnurm and Heitman, 2005). The FphA protein was found exclusively in the cytoplasm, evidence that suggests that at least part of the red-light photoreception occurs in the cytoplasm (Blumenstein *et al.*, 2005). Although our study showed that red light had a mild effect on the VeA subcellular localization, it is possible that VeA could interact with FphA. The fact that the *fphA* mutant presents an increase in cleistothecial formation in the light with respect to the wild type (Blumenstein *et al.*, 2005) supports our hypothesis. Another line of evidence supporting our hypothesis is the fact that the *fphA* mutant phenotype is only observed in VeA strains and not in VeA1 (Blumenstein *et al.*, 2005). According to our results, the cytoplasmic localization of the VeA1 protein form indicates that the truncated bipartite NLS in VeA1 is not functional and fails to efficiently accumulate in the nucleus independently of illumination and most likely independently of the phytochrome FphA. We are currently studying the relationship between FphA and VeA. It is interesting that both *veA* and *fphA* are conserved in other filamentous fungi but are not found in yeast genomes suggesting that this light-response mechanism is exclusive to filamentous fungi. In our study, the nuclear localization of VeA when expressed in *S. cerevisiae* was light-independent.

Additional elements could participate in a complex light response. Although the *fphA* mutant presented an increase in cleistothecial formation under the light, the number of cleistothecia was still considerably lower than that found in the wild type growing in the dark, suggesting additional sensor systems (Blumenstein *et al.*, 2005). The *fluG* gene, first described by Lee and Adams (1994), seems to be one of those candidate elements: Yager *et al.* (1998) described *fluG* mutants with restored light-dependent conidiation in the *veA1* (which conidiates independently in red light), indicating a possible involvement of the FluG protein in the red light response. The functional dependence of FluG on FphA is unknown. Furthermore, the data presented by Blumenstein *et al.* (2005) also suggested additional sensors for red light besides FphA.

The response to blue light has been studied in detail in other fungi, including the filamentous fungus *Neurospora crassa* (Froehlich *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Response to blue light has also been indicated in *A. nidulans* (Yager *et al.*, 1998), reporting a *bliA1* mutant that lost the blue-light developmental response. The WC-1 and WC-2 proteins are required in the blue light-sensing mechanism in *N. crassa* (Froehlich *et al.*, 2002; He *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003). Although orthologues of both white collar genes were found in the *A. nidulans* genome, much of the response to blue light remains unknown in this model fungus. In our experiment we found a strong effect of blue light in preventing efficient VeA accumulation to the nuclei, similar to that shown in the presence of white light. Further research is needed to elucidate the possible interactions between VeA and proteins responsive to blue light in *A. nidulans*.

Our work together with previous studies reflects the complexity of fungal sensing mechanism to light (Mooney and Yager, 1990; Mooney *et al.*, 1990; Yager *et al.*, 1998; Blumenstein *et al.*, 2005; Idnurm and Heitman, 2005). Additionally, in Kato *et al.* (2003) we presented evidence indicating possible additional elements, besides VeA, that might contribute to integrate the light signal and the response to that signal, shown by differences in the transcription of developmental and secondary metabolite genes in the light and in the dark in the absence of VeA.

In *A. nidulans*, *veA* is required not only for normal morphological development but also for the production of secondary metabolites. Our group discovered a connection between *veA* and secondary metabolism, among others, the production of the mycotoxin ST (Kato *et al.*, 2003). The results here presented suggest that although a small amount of VeA in the nucleus (such of VeA1 and VeA in the light) could be sufficient to activate the ST gene cluster, the highest amount of toxin was produced by the *veA+* strain growing in the dark, a condition that favoured the accumulation of VeA protein in the nucleus. In previ-

Table 1. Primers.

Primer name	Sequence	Restriction site ^a
79YGFPWTF	5'-CATTTTGTGTTATCCCTGCAGGATG-3'	PstI
97YGFP Δ NLSF	5'-CAAGCGCCTGCAGGATGGCTTGTGGTCAAGGTC-3'	PstI
110YGFP Δ veA1dF	5'-TTGAATTCTGCAGGATGCAGCAGCCCAAGCGCG-3'	PstI
80YGFP Δ PRSmal	5'-CAAATAAACCCCGGGAGAATTCTTTTA-3'	SmaI
92YtwohybrWTF	5'-CCATCACCATGGCTACACTTGCAGC-3'	NcoI
93TwoHybr Δ NLSF	5'-GCGCGACCATGGCTTGTGGTCAAGGTC-3'	NcoI
109YtwohybrveA1d	5'-GAGGACCTGCCATATGCCATGCAGCAGCCCAAGCGCG-3'	NdeI
95YTwohybrR	5'-GGCAGAGACTGCAGTTAACGCATGGTGGCAG-3'	PstI
GFP1	5'-CGGATGGTCTCAAAGCCTGCCACCATGCGTGGAGCTGGTGCAGGCGCTGGAGCC-3'	—
GFP2	5'-AACTATGACAAATAAACGCCGGCAGAAATTCGTCTGAGAGGAGGCACTGATGCG-3'	—
GSP1	5'-GAATCGGATCCCCATGACGACAGCAATAAG-3'	—
GSP2	5'-ACGCATGGTGGCAGGCTTTGAGACCATCCG-3'	—
GSP3	5'-GAATTCTGCCGGCGTTTATTTGTCATAGTT-3'	—
GSP4	5'-GAATGCGGACGCAATGGCTTTGCCGAAGCG-3'	—
2060F	5'-AGAACAGAGGACTACGAC-3'	—
VeAGFP3R	5'-ACGCATGGTGGCAGGCT-3'	—
F-testveAGFP	5'-GAAATCGCACACCGACCGCC-3'	—
R-testveAGFP	5'-CGTATCCCTCAGGCATGGCG-3'	—
α 5	5'-GCGGATCCGAGTTACCAGAGATGGTC-3'	BamHI
α 6	5'-GCGGATCCCATATCCATGGAATCGCC-3'	BamHI

a. Restriction sites are underlined in primer sequence.

ous studies we demonstrated that VeA regulates the expression of the ST-specific transcription factor gene *afIR* as well as expression of enzymatic genes in the ST gene cluster (Kato *et al.*, 2003) supporting a VeA regulatory action in the nucleus regarding mycotoxin production.

Accumulation of VeA in the nucleus in the dark must trigger a series of events that lead to the developmental stage observed in the *A. nidulans* *veA* wild-type strain. The VeA mechanism of action in the nucleus is at this time unclear, as VeA does not have homology with any known transcription factor or other proteins with known function. However, it has been demonstrated that VeA affects, directly or indirectly, the transcription of genes known to be involved in sexual and asexual development. In a previous report (Kato *et al.*, 2003) we showed that *veA* affects the α/β transcript ratio of *brlA*, encoding a transcription factor that controls conidiation events in *A. nidulans* (Han *et al.*, 1993; Han and Adams, 2001). Other developmental genes linked to *veA* are the Psi factor oxilipin genes that control a balance between asexual and sexual development (Calvo *et al.*, 2001; Tsitsigiannis *et al.*, 2004a,b; 2005). Deletion of *veA* completely prevents the expression of the oxilipin gene *ppoA*, coinciding with a blockage of sexual development and with an increase in conidiation (Tsitsigiannis *et al.*, 2004a). Additionally, the triple null mutation *ppoAppoBp-poc* alters *veA* expression, suggesting a regulatory loop between *ppo* genes and *veA* (Tsitsigiannis *et al.*, 2005). The expression of the sexual development transcription factors *nsdD* and *steA* was only slightly altered in the *veA* mutant (Kato *et al.*, 2003). However, it is possible that VeA regulation of these developmental factors could also occur post-transcriptionally.

The discovery of VeA light-dependent subcellular mobility is an important keystone to understand the mode of action through which *Aspergilli* exercise a complex developmental response to light stimulus thus adapting to their environment.

Experimental procedures

Saccharomyces cerevisiae procedures

The *S. cerevisiae* strains used in this study were W303-1a (*MATa ura3-1 leu2-3112 his3-11 trp1-1 can1-100*) and its isogenic derivative carrying the *srp1-31* thermosensitive mutation (Fernandez-Martinez *et al.*, 2003) for the microscopy analysis. The strain Y187 (Clontech, *MAT α ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3112 gal4 Δ met-gal80 Δ URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ MEL1*) was used for the two-hybrid system study. Strains were cultured in dextrose minimum medium with the appropriate supplements for plasmid selection maintenance.

All the *veA* alleles were expressed as N-terminal sGFP fusion proteins under the control of the *ADH1* promoter, in the centromeric plasmid pRS313 (Sikorski and Hieter, 1989). Plasmid construction for VeA::GFP expression in yeast was performed as follows. First cDNAs corresponding to the *veA*, *veA Δ NLS* and *veA1* alleles were amplified with the forward primers 79YGFPWTF (all the primers used in this study are listed in Table 1), 97YGFPNSL and 110YGFP, respectively, and the reverse primer 80YGFP Δ PRSmal, and cloned into the PstI/SmaI sites of pBlueScript SK+ containing the ADH1 promoter [ADH1(p)] and into a similar plasmid with both ADH1(p) plus NLS_{SV40} [the fragments corresponding to ADH1(p) and ADH1(p)+NLS_{SV40} were previously inserted into XhoI/EcoRI sites in pBlueScript SK+ Fernandez-Martinez *et al.*, 2003]. XhoI/SmaI fragments were released from the resulting plasmids and ligated into XhoI/EcoRV sites of a modified pRS323 containing the ADH1 terminator (as described in Fernandez-

Table 2. Plasmids generated in this study.

Plasmid name	Description
pAMCA.1GFP	veA ⁺ in pSR323
pAMCA.2GFP	veA ⁺ plus NLSsv40 in pSR323
pAMC43GFP	veA _{NLS} in pSR323
pAMC45GFP	veA _{NLS} plus NLSsv40 in pSR323
pAMC52.12GFP	veA1 in pSR323
pAMC53.NLS2GFP	veA1 plus NLSsv40 in pSR323
pAMC46	veA ⁺ in pGBKT7
pAMC47	veA _{NLS} in pGBKT7
pAMC49	veA ⁺ N-truncation (EcoRI–PstI fragment) in pGBKT7
pAMC54	veA1 in pGBKT7

Martinez *et al.*, 2003). Finally, a fragment corresponding to the gene encoding GFP was inserted into a unique BamHI site in the multiclonal site of each plasmid (a BamHI site in the cDNAs was previously eliminated by a silent mutation TCCGATCCC). The plasmids obtained are listed in Table 2. pAMCA.1GFP, pAMCA2GFP, pAMC43GFP, pAMC45GFP, pAMC52.12GFP and pAMC53.NLS2GFP were used to transform *S. cerevisiae* W303-1a. pAMCA.1GFP and pAMCA.2GFP were also used to transform the *S. cerevisiae* *srp1-31* strain.

Plasmid construction for the yeast two-hybrid system studies was performed as follows. The cDNAs corresponding to the *veA*, *veA_{NLS}* and *veA1* alleles were amplified with the forward primers 92YtwohybrWTF, 93TwoHybrΔNLS and 109YtwohybrveA1d, respectively, and the reverse primer 95YTwohybrR. The PCR products corresponding to the *veA* and *veA_{NLS}* were digested with NcoI and PstI and inserted in NcoI/PstI sites of pGBKT7. The cDNA fragment corresponding to *veA1* was digested with NdeI and PstI and inserted in NdeI/PstI sites of pGBKT7. pGBKT7 is a suitable partner for pACT2 (*A. nidulans* cDNA encoding for KapA residues 83–551 was previously introduced as a NcoI fragment in pACT2). The resulting plasmids are listed in Table 2. An N-terminus truncated *veA* allele, *veA₁₈₆₋₅₇₃*, was generated by digesting pAMC46 (Table 2) with EcoRI (the EcoRI in *veA* is in frame with the EcoRI site of pGBKT7) and religation of the plasmid resulting in pAMC49. pAMC46, pAMC47, pAMC49 and pAMC54 were introduced in *S. cerevisiae* Y187. Yeast transformation and β-galactosidase assays were carried out as previously described (Vincent *et al.*, 2002). For green fluorescence observation, yeast cells were cultured in SD medium until reaching a cell density of $A_{600} = 0.6$ – 0.8 . Afterwards, cells were pelleted and resuspended in 0.05 of the original volume and mounted for visualization.

In vitro interaction analyses were performed using TNT (Promega) expressed *VeA* forms using the pGBKT7 derivatives for two-hybrid analysis, and bacterially expressed ZZ::KapA⁵⁰ (83–551) and ZZ tag alone as control. *In vitro* synthesized *VeA* proteins we performed as described by the manufacturer (T7-TNT Promega) and labelled with Methionine-S³⁵ (Amersham). Plasmid pQE80zz (a gift from Dr D. Görlich) was used to express ZZ::KapA⁵⁰. The KapA⁵⁰-coding fragment was PCR-amplified from cDNA using oligonucleotides α5 and α6 (Table 1) and cloned into the BamHI site of pQE80zz. Plasmids expressing either ZZ::KapA⁵⁰ or ZZ were introduced into *Escherichia coli* DH1. Transformants

were grown for 16 h at 30°C in LB broth plus 100 µg ml⁻¹ ampicillin. Cultures were diluted 1/50 with fresh medium and further incubated at 30°C until cell density reached 0.6 units OD at 600 nm. Expression of ZZ::KapA⁵⁰ or ZZ was induced by addition of 0.1 mM IPTG followed by 3 h incubation at 30°C. Cells were collected by centrifugation and resuspended in binding buffer (buffer B, 50 mM Tris HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂) containing complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). The cell suspension was lysed with a French Press. Samples were clarified by centrifugation for 15 min at 14 000 r.p.m., 4°C. Supernatants were stored at –80°C.

For the *in vitro* interaction analyses, IgG-sepharose (Roche) was loaded with either ZZ-tagged KapA⁵⁰ or ZZ as follows: 20 µl of the matrix were incubated with 300 µg of an *E. coli* extract expressing ZZ or ZZ::KapA⁵⁰ in HNA buffer (50 mM HEPES/KOH pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM magnesium acetate and complete protease inhibitor cocktail), in a final volume of 1.5 ml. The matrix was washed three times with HNA buffer before utilization. For each experiment similar amounts of labelled S³⁵-Methionine-*VeA* protein TNT mixtures were incubated for 16 h at 4°C in a rotary wheel with either ZZ or ZZ-KapA⁵⁰; bound to the IgG-sepharose. Each experiment was washed three times with 1 ml each of HNA buffer. Protein samples were dissolved in SDS-PAGE loading buffer containing 1% v/v β-mercaptoethanol, boiled for 5 min and desolved on a 10% SDS-PAGE, stained with Coomassie blue, dried and exposed to S³⁵-sensitive film.

Western blot analysis

Protein extracts were obtained from mycelia grown on GMM for 18 h in the dark. The mycelia were frozen on dry-ice and lyophilized. Proteins were extracted in the following buffer: 5 mM HEPES pH 7.5, 20 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 10% NP40, 0.5 mM DTT, 1 mM Pefablock, 1 mM Pepstatin, 0.6 mM Leupeptin. Protein quantification was carried out by the commonly used Bradford method. Fifty micrograms of total protein from *VeA*::GFP, *VeA1*::GFP and untagged *VeA* strains were used for Western analysis. The filter was probed with a mouse polyclonal primary antibody against GFP (Roche) in a 1:10.000 dilution; the secondary antibody was used in a 1:4.000 dilution (Jackson).

Insertion of the gfp tag in the *veA* locus in *A. nidulans*

We used the three-way PCR-based 3' GFP tagging protocol described by Yang *et al.* (2004) to generate the *veA*::gfp transformation cassette. The method leads to an in-frame integration of GFP just before the stop codon of *veA*. The GFP cassette generated includes a hinge region encoding five Gly–Ala repeats in frame at the N-terminus of GFP, next to the *A. fumigatus* *pyrG* gene that was used as a selectable marker for fungal transformation. The use of *A. fumigatus* *pyrG* instead of the *A. nidulans* *pyrG* reduces integrations at the *pyrG* locus. In brief, as an initial step, three separate fragments were amplified. All the primers of this section are listed in Table 1. First, the GFP cassette was amplified by PCR, using primers GFP1 and GFP2 and using p1439 (containing GFP plus *A. fumigatus* *pyrG*) (the p1439 plasmid was

Table 3. *Aspergillus nidulans* strains used in this study.

Strain	Pertinent genotype	Source
RRMD3.4	<i>pyrG89; pyroA4; veA+</i>	This study
FGSC A773	<i>pyrG89; pyroA4; veA1</i>	Fungal Genetics Stock Center
TRMD3.4.17	<i>pyroA4; veA+::gfp::pyrG^{A.fumigatus}</i>	This study
TA773.B13	<i>pyroA4; veA1::gfp::pyrG^{A.fumigatus}</i>	This study
RNKT5.1	<i>pyroA4; veA+</i>	This study
REE1	<i>pyroA4; veA1</i>	This study

kindly provided by Stephen Osmani) as a template. The second PCR fragment corresponding to the upstream targeting region (the 3' end in *veA*-coding region) was PCR-amplified using primers GSP1 and GSP2 with pPK11 (containing the full-length *veA*-coding region) (gift from Larry Yager) as a template. The third amplified fragment contains the *veA* stop codon and the 3' untranslated region and was amplified using primers GSP3 and GSP4 with FGSC4 genomic DNA as template. The overlapping ends of the three described PCR products allows a three-way PCR fusion, amplified by using all three fragments as a template in one PCR reaction where the primers GSP1 and GSP4 are used. All PCRs were performed using the Boehringer Mannheim Expand Long Template PCR kit. In the case of *veA1* strains, *gfp* tagging was carried out following the same procedure.

The final PCR product was used to transform two *A. nidulans* strains, one with a *veA* wild-type allele, RRMD3.4 (Table 3), and a second strain with a *veA1* allele, FGSC A773 (Table 3). The fungal transformation was carried out as previously described (Miller *et al.*, 1985). The integration of the tag occurs via a double-cross-over event. The complete list of *A. nidulans* strains used in this study is provided in Table 3.

Aspergillus nidulans culture conditions

Aspergillus nidulans conidia from TRMD3.4.17 and TA773.B13 transformants and corresponding isogenic controls (Table 2) were inoculated onto coverslips and overlaid with minimal media (GMM, Calvo *et al.*, 2002) plus the appropriate supplements (Käfer, 1977). The coverslips were incubated at 26°C and 37°C for 25 h (18 h and 20 h gave the same results) in the light (approximately 25 mE m⁻² s⁻¹) or in the dark. The experiment using blue (440–500 nm) and red (625–740 nm) light filters (Arbor Scientific) were carried out in the same manner as described above. For the shift experiment, the *VeA::GFP* strain was grown for 18 h in the light or in the dark and then shifted from light to dark and from dark to light. Samples were harvested and visualized at the shift time and 30 and 60 min after the shift.

All samples were prepared for microscopy analysis as described below. The experiment was repeated four times with similar results. Cultures for mycotoxin biosynthesis evaluation of *A. nidulans* *veA* wild-type strain versus *veA1* mutant were performed as follows: conidia from RNKT5.1 and REE1 as well as from TRMD3.4.17 and TA773.B13 (Table 3) were inoculated on plates containing 25 ml of GMM agar. For each plate, a 5 ml top layer of cold but molten agar that contained 10⁶ spores of the appropriate strain was added. For each strain, there was a minimum of three repli-

cate plates. Strains were grown at 37°C in continuous light or dark. The experiment was performed in triplicate.

Microscopy

Phosphate-buffered saline (PBS) with 4% (v/v) paraformaldehyde was used to fix the cultures. After three washes in PBS, the coverslips were stained with DAPI (6 ng ml⁻¹ in PBS) for 15 min followed by another three PBS washes. The subcellular distribution of green fluorescence was observed with an ORCA-ER digital camera (Hamamatsu) coupled to a NIKON E-600 microscope equipped with a 60× objective and 495 and 530 nm excitation and emission filters. No autofluorescence was observed. All images were taken using the same exposure and microscope settings.

Mycotoxin analysis

Four cores (11 mm diameter) from each replicate were collected in a 50 ml Falcon tube, and ST was extracted by adding 5 ml of CHCl₃ three consecutive times. The extracts were allowed to dry and then resuspended in 500 µl of CHCl₃ before 15 µl of each extract was fractionated on a silica gel thin-layer chromatography (TLC) plate using a toluene-ethyl acetate-acetic acid [80:10:10 (v/v/v)] solvent system. The TLC plates were sprayed with aluminum chloride (15% in ethanol) to intensify ST fluorescence upon exposure to long-wave (365 nm) UV light and baked for 10 min at 80°C prior to being viewed. The approximate sensitivity of the assay was 25 ng. ST purchased from Sigma was used as a standard.

Acknowledgements

We thank Naoki Kato, Kyung Myung, Tracy Gold, Javier Fernández-Martínez and Elena Reoyo for their technical assistance. We are grateful to Stephen Osmani and Larry Yager for providing us with plasmids used in this study and to Masashi Nomura for the *spr1-31* strain. We thank Northern Illinois University and the Ministerio de Educación y Ciencia (Grant BMC2003-00874 to E.A.E., L.A.-B. held a FPU) for providing funds to support this work.

References

- Adams, T.H., and Yu, J.H. (1998) Coordinate control of secondary metabolite production and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Curr Opin Microbiol* **1**: 674–677.
- Alexopoulos, C.J. (1962) *Introductory Mycology*. New York: John Wiley and Sons.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. (1996) *Introductory Mycology*, 4th edn. New York: John Wiley and Sons.
- Bernreiter, A., Ramon, A., Fernández-Martínez, J., Berger, H., Araújo-Bazan, L., Espeso, E.A., *et al.* (2006) Nuclear export of the transcription factor NirA is a regulatory checkpoint for nitrate induction in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* (in press).
- Blumenstein, A., Vienken, K., Tasler, R., Purschwitz, J., Veith, D., Frankenberg-Dinkel, N., and Fischer, R. (2005) The

- Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light. *Curr Biol* **15**: 1833–1838.
- Braus, G.H., Krappmann, S., and Eckert, S.E. (2002) Sexual development in ascomycetes: fruit body formation of *Aspergillus nidulans*. In *Molecular Biology of Fungal Development*. Osiewacz, H.D. (ed.). New York: Marcel Dekker, pp. 215–244.
- Calvo, A.M., Gardner, H.W., and Keller, N.P. (2001) Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **276**: 25766–25774.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W., and Keller, N.P. (2002) Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 447–459.
- Calvo, A.M., Bok, J., Brooks, W., and Keller, N.P. (2004) *veA* is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 4733–4739.
- Champe, S.P., Nagle, D.L., and Yager, L.N. (1994) Sexual sporulation. *Prog Ind Microbiol* **29**: 429–454.
- Clutterbuck, A.J. (1977) The genetics of conidiation in *Aspergillus nidulans*. In *Genetics and Physiology of Aspergillus*. Smith, J.E., and Pateman, J.A. (eds). London: Academic Press, pp. 305–317.
- Duran, R.M., Cary, J.W., and Calvo, A.M. (2006) Production of cyclopiazonic acid, aflatoxin, and aflatoxin by *Aspergillus flavus* is regulated by *veA*, a gene necessary for sclerotial formation. *Appl Microbiol Biotechnol* (Epub).
- Fernandez-Martinez, J., Brown, C.V., Diez, E., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr, Penalva, M.A., and Espeso, E.A. (2003) Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J Mol Biol* **334**: 667–684.
- Fontes, M.R., Teh, T., and Kobe, B. (2000) Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *J Mol Biol* **297**: 1183–1194.
- Fontes, M.R., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R.I., and Kobe, B. (2003a) Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin- α . *J Biol Chem* **278**: 27981–27987.
- Fontes, M.R., Teh, T., Toth, G., John, A., Pavo, I., Jans, D.A., and Kobe, B. (2003b) Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin- α . *Biochem J* **375**: 339–349.
- Froehlich, A.C., Liu, Y., Loros, J.J., and Dunlap, J.C. (2002) White collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the frequent promoter. *Science* **297**: 815–819.
- Han, S., and Adams, T.H. (2001) Complex control of the developmental regulatory locus *brlA* in *Aspergillus nidulans*. *Mol Genet Genomics* **266**: 260–270.
- Han, S., Navarro, J., Greve, R.A., and Adams, T.H. (1993) Translational repression of *brlA* expression prevents premature development in *Aspergillus*. *EMBO J* **12**: 2449–2457.
- He, Q., Cheng, P., Yang, Y., Wang, L., Gardner, K.H., and Liu, Y. (2002) White collar-1, a DNA binding transcription factor and a light sensor. *Science* **219**: 840–843.
- Hicks, J.K., Yu, J.H., Keller, N.P., and Adams, T.H. (1997) *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G alpha protein-dependent signaling pathway. *EMBO J* **16**: 4916–4923.
- Idnurm, A., and Heitman, J. (2005) Photosensing fungi: phytochrome in the spotlight. *Curr Biol* **15**: 829–832.
- Käfer, E. (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. *Adv Genet* **19**: 33–131.
- Kato, N., Brooks, W., and Calvo, A.M. (2003) The expression of sterigmatocystin and penicillin genes in *Aspergillus nidulans* is controlled by *veA*, a gene required for sexual development. *Eukaryot Cell* **2**: 1178–1186.
- Kim, H., Han, K., Kim, K., Han, D., Jahng, K., and Chae, K. (2002) The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* **37**: 72–80.
- Kutay, U., and Güttinger, S. (2005) Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol* **15**: 121–124.
- Lee, B.N., and Adams, T.H. (1994) Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development. *Mol Microbiol* **14**: 323–334.
- Liu, Y., He, Q., and Cheng, P. (2003) Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2131–2138.
- McCurdy, D.W., and Pratt, L.H. (1986) Immunogold electron microscopy of phytochrome in *Avena*: identification of intracellular sites responsible for phytochrome sequestering and enhanced pelletability. *J Cell Biol* **103**: 2541–2550.
- Miller, B.L., Miller, K.Y., and Timberlake, W.E. (1985) Direct and indirect gene replacements in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **5**: 1714–1721.
- Mooney, J.L., and Yager, L.N. (1990) Light is required for conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genes Dev* **4**: 1473–1482.
- Mooney, J.L., Hassett, D.E., and Yager, L.N. (1990) Genetic analysis of suppressors of the *veA1* mutation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **126**: 869–874.
- Nair, R., Carter, P., and Rost, B. (2003) NLSdb: database of nuclear localization signals. *Nucleic Acids Res* **31**: 397–399.
- Peñalva, M.A., and Arst, H.N., Jr (2004) Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* **58**: 425–451.
- Shimizu, K., and Keller, N.P. (2001) Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signaling pathway regulating morphological and chemical transitions in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **157**: 591–600.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19–27.
- Skromne, I., Sanchez, O., and Aguirre, J. (1995) Starvation stress modulates the expression of the *Aspergillus nidulans brlA* regulatory gene. *Microbiology* **141**: 21–28.
- Toews, M.W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P., Veith, D., Vienken, K., et al. (2004) Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination *in vitro* (GATEWAY). *Curr Genet* **45**: 383–389.
- Tsitsigiannis, D.I., Zarnowski, R., and Keller, N.P. (2004a) The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and

- asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **279**: 11344–11353.
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M., Zarnowski, R., and Keller, N.P. (2004b) Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1398–1411.
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M., Zarnowski, R., and Keller, N.P. (2005) Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **151**: 1809–1821.
- Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H.N., and Penalva, M.A. (2002) YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue AIP1/Alix. *Mol Cell Biol* **23**: 1647–1655.
- Yager, L.N. (1992) Early developmental events during asexual and sexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Biotechnology* **23**: 19–41.
- Yager, L.N., Lee, H., Nagle, D.L., and Zimmerman, J.E. (1998) Analysis of *fluG* mutations that affect light-dependent conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **149**: 1777–1786.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P.C., *et al.* (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1359–1362.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Fig. S1. Western blot analysis. Protein extracts were obtained from mycelia grown on GMM 18 h in the dark. The mycelia were frozen on dry-ice and lyophilized. Fifty micrograms of total protein from VeA+:GFP, VeA1::GFP and untagged VeA strains were used. VeA::GFP was more abundant than VeA1::GFP.

Fig. S2. The *A. nidulans* strains containing the VeA::GFP or VeA1::GFP fusion conserved the original morphological phenotype regarding asexual and sexual development.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

NapA and NapB are the *Aspergillus nidulans* Nap/SET family members and NapB is a nuclear protein specifically interacting with importin α

Lidia Araújo-Bazán^a, Javier Fernández-Martínez^{a,1}, Vivian Maythe de los Ríos^{b,c,1}, Oier Etxebeste^{a,d}, Juan Pablo Albar^b, Miguel Ángel Peñalva^a, Eduardo Antonio Espeso^{a,*}

^a Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu, 9, Madrid 28040, Spain

^b Laboratorio de Proteómica, Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid 28039, Spain

^c Laboratorio de Proteómica, Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid 28040, Spain

^d Laboratorio de Química Microbiana, Facultad de Químicas, Universidad País Vasco, San Sebastián 20018, Spain

Received 9 May 2007; accepted 9 August 2007

Available online 17 August 2007

Abstract

In eukaryotic cells, importin α is the major carrier for transport protein cargoes into the nucleus. We characterize here *kapA*, the single *Aspergillus nidulans* gene encoding an importin α . Using an affinity approach, we identify six potential interactors of KapA⁵⁰, a deleted version of KapA lacking the autoinhibitory importin-beta-binding domain. One such interactor is NapB, the *A. nidulans* orthologue of *Saccharomyces cerevisiae* Vps75p, a histone chaperone member of the Nap/SET family of proteins that additionally plays a cytosolic role in vacuolar protein sorting. NapB, but not its close relative NapA (the *A. nidulans* orthologue of yeast Nap1p) interacts directly with KapA⁵⁰ in pull down assays, despite the fact that NapB does not contain a classical nuclear localization sequence. NapB is a nuclear protein which exits nuclei at the onset of mitosis when two simultaneous mechanisms might be acting, the partial disassembly of the nuclear pore complexes and as yet unidentified posttranslational modification of NapB. The mitotic cytosolic localization of NapB might facilitate its putative role in the sorting of protein cargoes to the vacuole. In addition, we show that NapB and the mitotic B-type cyclin NimE compete for *in vitro* binding to KapA.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Aspergillus nidulans*; Fungi; Importin α ; Nucleosome assembly proteins; Nuclear transport

1. Introduction

The eukaryotic cell nucleus is delimited by a double membrane, the nuclear envelope which, by separating the nucleoplasm from the cytoplasm, uncouples DNA replication and transcription from protein synthesis and plays an important role in the regulation of gene expression. Bidirectional trafficking of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm occurs through the nuclear pore complex (NPC). Nuclear import and export are energy requiring processes mediated by a family of proteins called

karyopherins, whose paradigm is the β 1 importin. Karyopherins specifically recognize their substrates either by direct binding or by using other proteins as adaptors. The best characterized nuclear import pathway is mediated by the importin β 1/importin α heterodimer (reviewed in Fried and Kutay, 2003; Gorlich and Kutay, 1999, and references therein), where importin α was initially described as a mere adapter for the importin β 1, the true protein carrier (Goldfarb et al., 2004). The energy required for nuclear import/export is given by the hydrolysis of GTP by the small GTPase Ran. In the cytosol, due to the low levels of RanGTP, importin β 1 binds with high affinity to the importin β 1 binding domain (IBB) in importin α . In the resulting heterodimeric complex, importin α is competent for binding its cargoes by specifically recognizing basic

* Corresponding author. Fax: +34 91 536 0432.

E-mail address: eespeso@cib.csic.es (E.A. Espeso).

¹ These two authors contributed equally to this work.

residue-rich, short amino acid sequence motifs acting as nuclear localization signals (NLSs). Those NLSs exclusively bound by an importin α are called “classical” NLSs (cNLS) and can be either monopartite or bipartite (see Fontes et al., 2000, and references therein). Cargoes bound to the importin α /importin β heterocomplex migrate through the NPC into the nucleus. In the nucleoplasm, the elevated levels of Ran in its GTP-bound state promote the disassembly of the importin β /importin α -cargo heterocomplex by direct interaction of Ran-GTP with importin β (reviewed in Gorlich and Kutay, 1999). The cargo is then released into the nucleus and the import factors are recycled to the cytoplasm. Importin β exits the nucleus bound to Ran-GTP (Gorlich and Kutay, 1999) and importin α is exported by the exportin CAS/Cse1p, in a Ran-GTP dependent manner (Hood and Silver, 1998).

Certain aspects of this general model of nuclear transport have been revisited. For example, in tobacco cells importin α can mediate the nuclear transport of proteins independently of importin β (Hubner et al., 1999) and binds to a variety of nuclear localization signals not completely conforming to the established consensus. In these cases, importin α is helped by cofactors that increase its affinity or nuclear import rate for the cargoes. Among these “helpers” are Hsp70 and Npap60. The Hsp70 heat shock chaperone can recognize amino acid sequence motifs close to the NLS consensus (Takenaka et al., 1995), and it has been suggested that Ssa1p (*Saccharomyces cerevisiae* Hsp70) promotes the formation and stability of the importin α (Srp1p)-NLS-cargo complex (Shulga et al., 1996). Human Npap60 was initially described as a nucleoporin (a component of the NPC), that associates with the importin β /importin α heterocomplex and stimulates nuclear import of cNLS-containing cargoes (revised in Moore, 2003). In view of these examples, it is generally accepted that importin α -mediated nuclear import may include additional and diverse cofactors, ensuring that a large number of divergent nuclear proteins can be imported into the nucleus in an appropriate and efficient mode in response to different stimuli.

Nuclear transport of macromolecules has been mainly studied in mono-nucleated cells. Many filamentous ascomycete fungi have a coenocytic organization, with several nuclei per cell compartment. To ensure a meaningful response to environmental factors, regulatory proteins must enter the all of nuclei of a cell in a coordinated manner, allowing an orchestrated nuclear response. We hypothesized that this would impose additional needs on the nuclear import machinery and set out to identify novel components of the importin α mediated pathway in the model filamentous ascomycete *Aspergillus nidulans* using an affinity approach.

We describe here the identification of *in vitro* interactors of *A. nidulans* importin α . One of these is NapB, a member of the nucleosome assembly protein family including Nap and SET protein subfamilies. A second member of this family of proteins has been characterized, NapA the puta-

tive orthologue of yeast Nap1p. Nap/SET proteins play nuclear roles in chromatin remodeling, histone metabolism and cell cycle progression (Canela et al., 2003; Kellogg et al., 1995; Miyaji-Yamaguchi et al., 2003; Mosammamapara et al., 2002; Park et al., 2005). Interestingly, in contrast to the described interaction between B-type cyclins and the Nap/SET proteins (Archambault et al., 2004; Canela et al., 2003; Kellogg et al., 1995) we have been unable to detect *in vitro* interaction of NapA or NapB with the mitotic B-type cyclin NimE (O’Connell et al., 1992). NapB shows nuclear localization in interphase and exits the nuclei at the onset of mitosis, when the nuclear pore complex is disassembled (De Souza et al., 2004) and in response to an unknown posttranslational modifying mechanism. NapB interacts directly with importin α , strongly suggesting that it is a cargo of this nuclear importer.

2. Materials and methods

2.1. Strains and materials

The *A. nidulans* yA2 pabaA1 strain (MAD1116) was used for making protein extracts. TNO2A3 (MAD1425), with genotype: *pyroA4*, *pyrG89*, Δ *nkuA::argB* strain (a gift from B. Oakley) was used as recipient of construct *napB::gfp*. Strains expressing *pacC700* allele, GFP::*PacC*(5–250), and mutant forms carrying S131A or P138F substitutions have been described in Fernandez-Martinez et al. (2003). A strain carrying GFP tagged An-Nic96 has been described in Osmani et al. (2006). Minimal and complete media for *A. nidulans* have been described (Cove, 1966). *Escherichia coli* DH1 strain was used for standard cloning techniques and recombinant protein expression. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in yeast-two hybrid screenings were Y187 and AH109 from Matchmaker III system (Clontech), wild type strain W303-1a was used in microscopy. IgG-sepharose was from GE Healthcare (Little Chalfont, UK).

2.2. Gene identification, cloning, and GFP tagging

We used in TBLASTN searches of the *A. nidulans* database (http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/annotation/aspergillus/blast_page.cgi) the human importin- α 1 (AAH02374), α 2 (AAH05978), α 3 (AAH24202), α 4 (AAH28691), α 5 (AAH47409), and α 6 (AAH20520) family members and *S. cerevisiae* Srp1p (AAA35090).

Aspergillus nidulans *kapA* was amplified from genomic and cDNA using oligonucleotides α 1 and α 4 (Supplementary Table 1) and sequenced. The *kapA* cDNA sequence has been deposited at the GenBank (Accession Number AF465210). Nucleosome assembly proteins coding genes *napA* and *napB* were amplified from genomic and cDNA using oligonucleotides for *napA*: *napUP* and *napDW* and for *napB*: *nap1* and *nap2* (see Supplementary Table 1). The *napA* and *napB* cDNA sequences have been deposited at GenBank with the Accession Numbers EF592166 and DQ004246, respectively.

cDNA from genes encoding NnukA, Hsp70/AN5129.3, Hsp90/AN8269.3, NudK, NapB, KapB, and NimE were amplified using specific primers (see [Supplementary Table 1](#)), Pfu polymerase (Promega), and as template single stranded cDNA synthesized from a Cloned AMV First-strand Synthesis kit (Invitrogen) and a 24 h total RNA sample following manufacturer instructions. PCR amplified fragments were digested with EcoRI and BamHI restriction enzymes and introduced at the same sites in pGBKT7 (Clontech) polylinker. pGBKT7 derivatives were used in yeast-two hybrid assays and/or for TNT (Promega) based *in vitro* translation. Amplified *nimE* cDNA was digested with BamHI and cloned into pC20, a modified version of pET-19b (Novagen) lacking the 10×His tag and used in TNT (Promega). *kapB* cDNA was introduced into a modified version of pGADT7-rec (Clontech) lacking the ADHI promoter using the gap repair technique (Clontech) and primers SM-KapB and CDS-KapB.

Aspergillus nidulans Kap114p homologue, KapG/AN2163.3, was identified using the Blastp program and the Kap114p amino acid sequence. *kapG* cDNA was amplified using primers KapG1 and KapG2 (see [Supplementary Table 1](#)) and cloned into pCR2.1-TOPO. pTOPO-KapG was used in TNT to express KapG protein for pull down assays.

Tagging of NapB with GFP was done as described in [Yang et al. \(2004\)](#) and taking advantage of the new strains deficient in heterologous recombination ([Nayak et al., 2006](#)). The 3' end of the gene, 1.5 kb, and the 3' UTR region were amplified with primers NapB1 and NapB2, NapB3 and NapB4, respectively (see [Supplementary Table 1](#)) and fused in a 3 way PCR with a fragment, amplified with primers NapB-GFP1 and NapB-GFP2, containing the *gfp* gene together with the selectable marker *A. fumigatus pyrG* gene ([Yang et al., 2004](#)). The fusion cassette was transformed into MAD1425 strain following the protocol previously described ([Tilburn et al., 1983](#)). Uracil prototrophs were selected and homokaryons were analyzed by Southern for a single copy integration of the cassette.

To express the GFP::NapB fusion in *S. cerevisiae* we followed the procedure described in [Fernandez-Martinez et al. \(2003\)](#).

2.3. Expression and purification of recombinant and *in vitro* expressed proteins

Plasmids pQE80zz (a gift from Dr. D. Görlich) ([Mingot et al., 2001b](#)) and pGEX-2T were used to express ZZ::KapA⁵⁰ and GST::NapB, respectively. The KapA⁵⁰-coding fragment was PCR-amplified from cDNA using oligonucleotides $\alpha 5$ and $\alpha 6$, each containing a newly BamHI restriction site ([Supplementary Table 1](#), shown in *italics*), and cloned into the BamHI site of pQE80zz. *napA* and *napB* cDNAs were amplified using oligonucleotides napUP and napDW for *napA* (see preceding section) and nap3 and nap4 for *napB*. Amplified fragments were double digested with BamHI and EcoRI ([Supplementary Table 1](#), novel

sites are indicated in *italics*) and cloned into the pGEX-2T polylinker digested with the same restriction enzymes. Pfu polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was used to prevent undesired mutations resulting from PCR.

Plasmids expressing either ZZ::KapA⁵⁰ or ZZ alone, and GST::NapB were introduced into *E. coli* DH1. Transformants were grown for 16 h at 30 °C in LB broth plus 100 µg/ml of ampicillin. Cultures were diluted 1/50 with fresh medium and further incubated at 30 °C until cell density reached 0.6 U O.D. at 600 nm. Expression of ZZ, ZZ::KapA⁵⁰ and GST::NapB was induced by addition of 0.1 mM IPTG followed by a 3 h incubation at 30 °C. Cells were collected by centrifugation and resuspended in binding buffer (buffer B, 50 mM Tris–HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM MgCl₂) containing complete protease inhibitor cocktail (Roche). The cell suspension was lysed with a French Press. Samples were clarified by centrifugation for 15 min at 14,000 rpm, 4 °C. Supernatants were stored at –80 °C. We used TNT coupled transcription translation kit (Invitrogen) to express radioactive, [³⁵S]-methionine, labeled proteins following the protocol from the manufacturer.

2.4. Affinity chromatography

Aspergillus nidulans total protein crude extract was obtained as described in [Diez et al. \(2002\)](#). MFA broth ([Orejas et al., 1995](#)), buffered at acidic pH with Na₂HPO₄ to a final concentration of 100 mM, was inoculated with 3×10^6 conidiospores of the MAD1116 strain. Mycelium was collected after 16 h of growth at 37 °C and lyophilized. 200 mg of dry mycelia was grounded using a Fast-Prep 120 cell disruptor (Savant Bio101 Inc) and proteins were extracted as in [Diez et al. \(2002\)](#), using 1 ml of A50 buffer plus protease inhibitors (Roche), followed by gentle shaking for 30 min at 4 °C in a rotary wheel. Extracts were clarified by centrifugation at 14,000 rpm and 4 °C for 30 min and stored at –80 °C.

IgG-sepharose was loaded either with ZZ-tagged KapA⁵⁰ or ZZ as follows: 20 µl of the matrix were incubated with 300 µg of an *E. coli* extract expressing ZZ::KapA⁵⁰ or ZZ in HNA buffer (50 mM Hepes/KOH pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM magnesium acetate and complete protease inhibitor cocktail), in a final volume of 1.5 ml. The matrix was washed three times with HNA buffer before utilization. Non-specific IgG-sepharose binding proteins were removed incubating 4 mg of *Aspergillus* total protein crude extract with 250 µl of matrix in a rotary wheel for 4 h at 4 °C. The sample was loaded onto a Micro Bio-spin chromatography column (Bio-Rad), the flow-through was collected and incubated with 25 µl of IgG-sepharose loaded with ZZ-KapA⁵⁰ or ZZ for 4 h in a rotary wheel at 4 °C. Samples were loaded onto a new Micro Bio-spin column, the flow-throw was discarded and the matrix was washed six times with 1 ml each of HNA buffer. After a final 1 h wash with 1 ml of HNA buffer on a rotary wheel, KapA⁵⁰ bound proteins were eluted with 1.5 M MgCl₂ and

precipitated using an equal volume of 10% w/v TCA diluted in acetone plus 20 mM DTT for 40 min at -20°C . Precipitated proteins were pelleted by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min at 4°C , followed by three wash steps with an ice cold solution of acetone plus 20 mM DTT. The protein pellet was vacuum dried and stored at -80°C until used.

2.5. SDS-PAGE and MS analysis

Protein samples were dissolved in SDS-PAGE-loading buffer with 1% v/v β -mercaptoethanol, boiled for 5 min and resolved on a 10% SDS-PAGE. Gels were stained using the silver-staining kit Plus-OneTM (Amersham) and the indications of the manufacturer for further MS analysis. Silver-stained bands were excised manually and processed automatically using an Investigator ProGest automatic digester (Genomic Solutions, Cambridgeshire, UK). The digestion protocol was essentially as described by Shevchenko et al. (1996), with minor modifications. Gel bands were soaked 20 min in 50 mM NH_4HCO_3 , followed by 10 min incubation with ACN to dehydrate the gel piece. Digester temperature was raised to 56°C and proteins were reduced in 10 mM DTT plus 25 mM NH_4HCO_3 . After 10 min, heaters were switched off and samples were incubated in reducing solution for 20 additional minutes. Then, samples were alkylated for 15 min at room temperature in 100 mM iodoacetamide, 50 mM NH_4HCO_3 and washed 10 min in 50 mM NH_4HCO_3 . After the washing step, gel pieces were dehydrated for 15 min with ACN. Finally, sequencing grade modified porcine trypsin (Promega) was added to the samples at a final concentration of 16 ng/ μl in 25 mM NH_4HCO_3 and further incubated at 37°C for 6 h. Gel pieces were washed with 50 mM NH_4HCO_3 and peptides were sequentially extracted with 25 mM NH_4HCO_3 for 15 min, 0.1% TFA in water for 15 min and ACN for 15 min, to a final volume of 100 μl .

2.6. MALDI peptide mass fingerprinting and database searching

Trypsin peptides were dried in a SpeedVac and resuspended in 10 μl of TA solution (33% ACN in water, 0.1% TFA). A 0.3 μl aliquot of each sample was manually deposited onto a 400 μm diameter AnchorChip MALDI probe (Bruker Daltonic, Bremen, Germany) and allowed to dry at room temperature. Then, 0.3 μl of matrix solution (a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ saturated solution of 2,5-dihydroxybenzoic acid in TA solution) was added and dried at room temperature. Samples were automatically analyzed in a MALDI-TOF Bruker ReflexTM IV MALDI time of flight mass spectrometer (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Germany) equipped with the SCOUTTM source in positive ion reflector mode using delayed extraction. The ion acceleration voltage was 20 kV. The equipment was externally calibrated with protonated mass signals from a peptide mix-

ture covering the 1000–3200 m/z range and every spectrum was internally calibrated by using selected signals arising from trypsin autoproteolysis to reach a typical mass measurement accuracy of ± 30 ppm. Measured tryptic peptide mass values were transferred using the MS Bio ToolsTM (Bruker) program as inputs to search the National Center for Biotechnology Information non-redundant database by using MascotTM software (Matrix Science, London, UK). Searches were done using *A. nidulans* database (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>) and allowing a protein molecular mass range of 1–200 kDa. Up to one missed tryptic cleavage was considered, and a mass accuracy of 50 ppm was used for all tryptic mass searches. Only protein identifications with score values higher than that signaling identity or extensive similarities were accepted and further manual analysis was carried out to avoid misidentifications.

2.7. Microscopy

Observations of *Aspergillus* fluorescent strains were done in “watch minimal medium” WMM as previously described in Penalva (2005). *Aspergillus* strains were grown onto coverslips immersed into supplemented WMM at 25°C during 16 h. In energy depleting conditions 15 mM azide and 15 mM sodium fluoride were added to the medium and samples were observed after 10 min incubation at 25°C . When required samples were fixed with 4% p-formaldehyde in PBS (Phosphate Buffer Saline) at 4°C for 16 h, washed three times with PBS and stained with a solution of DAPI 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 50% glycerol for 5 min at room temperature, washed once with 50% glycerol and then mounted and imaged. Green fluorescence was analyzed using a Nikon-E600 microscope equipped with a B-2A filter, and DAPI using a UV-2A filter. NapB::GFP movie was obtained using a Leica DMI6000B microscope and an incubator at 37°C . Each frame of movie 1 is the maximum projection 3D-deconvoluted of 4 planes imaged every 5 min during 1 h for 100 ms. Images and movie 1 were recorded using a Hamamatsu Orca-ER digital camera and Metamorph software (Universal Image). GFP::PacC movies were obtained using an inverted Nikon TE300 microscope associated with a confocal Ultraview Spinning-disc (Perkin-Elmer), controlled with Ultraview Software (Perkin-Elmer). Each frame from movies 2, 3, and 4 is the maximum projection of 10 planes imaged every 90 s with an exposure time of 0.5 s per plane.

Microscopy of *S. cerevisiae* GFP::NapB expressing cells was done as described in Fernandez-Martinez et al. (2003).

3. Results

3.1. Characterization of *kapA*, the single importin α gene in *A. nidulans*

By using the amino acid sequences of Srp1p (the single importin α in *S. cerevisiae*) and its six human homologues

in tBLASTn searches, we detected in the genome of *A. nidulans* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>) a single importin α gene, that we named *kapA*. Additional *A. nidulans* database searches for proteins containing the two PFAM domains characterizing importin α family members, the importin β binding (IBB, PF01749) and the armadillo/ β -catenin like domain (PF00514), did not reveal any other gene encoding an additional importin α . The armadillo/ β -catenin domain search, however, detected an orthologue of *S. cerevisiae* Vac8p, a vacuolar protein that has been previously shown to contain armadillo repeats.

We PCR-amplified and characterized genomic and cDNA versions of *kapA*, whose nt sequence comparison revealed that the KapA ORF is split by two introns, 224 and 56 bp long (GenBank Accession No. AF465210; [Supplementary Fig. 1A](#)). The *kapA* ORF encodes a 553 residue protein with a predicted M_r of 60,626 Da showing 57% amino acid sequence identity to *S. cerevisiae* Srp1p, 85% and 95% identity to the single predicted importin α proteins from *A. fumigatus* and *Neurospora crassa*, respectively, 61% and 68% identity to the two importin α proteins from *Schizosaccharomyces pombe* and 46–58% identity to the six human importin α family members.

KapA contains N-terminal importin β binding (IBB) and auto-inhibitory (AID) domains and the putative binding sites for the specific importin α nuclear exporter, CAS/Cse1p ([Supplementary Fig. 1B–D](#)). The IBB domain includes conserved basic residues which have been shown to mediate interactions of importin α with the Heat repeats of importin β 1 ([Gorlich et al., 1996](#); [Weis et al., 1996](#)), strongly suggesting that the KapA IBB domain mediates similar intermolecular interactions with the *A. nidulans* importin β 1 orthologue (KapB, [Osmani et al., 2006](#)). When importin β is not bound to the IBB, a sequence motif present in the AID occludes the cNLS binding site ([Harreman et al., 2003](#); [Kobe, 1999](#)) to prevent cargo binding. The importin α specific exporter, CAS/Cse1p, recognizes different motifs in the IBB domain and Armadillo repeat 10 ([Matsuura and Stewart, 2004](#)). Both groups of amino acids at the IBB involved in CAS/Cse1p interaction are highly conserved in KapA ([Supplementary Fig. 1C](#)). Alanine scanning mutagenesis of the armadillo repeat 10 in human importin α 2 identified an acidic residue crucially involved in interaction with human CAS ([Herold et al., 1998](#)). Although this acidic residue is conserved in Srp1p, the single *S. cerevisiae* importin α , it is absent from KapA ([Supplementary Fig. 1D](#)), suggesting that the interaction between KapA and the *A. nidulans* CAS/Cse1p homologue (KapE/AN6591.3) occurs through a different mechanism.

3.2. Identification of KapA interacting proteins using affinity chromatography

To identify putative importin α cargoes, we took advantage of an affinity approach previously used by others to reveal protein interactions amongst components of the

nuclear import/export machinery ([Mingot et al., 2001b](#), and references therein; [Fig. 1a](#)). We expressed in *E. coli* a recombinant protein containing two IgG-binding, tandemly repeated Z domains of *Staphylococcus aureus* Protein A attached to the N-terminus of KapA⁵⁰. KapA⁵⁰ is a 50 kDa truncated version of KapA lacking the IBB domain. Deletion of the IBB domain increases the expression levels of the fusion protein and prevents auto-inhibitory intramolecular interactions ([Harreman et al., 2003](#); [Kobe, 1999](#)) potentially masking binding surfaces for importin α interacting proteins. IgG-Sepharose bound

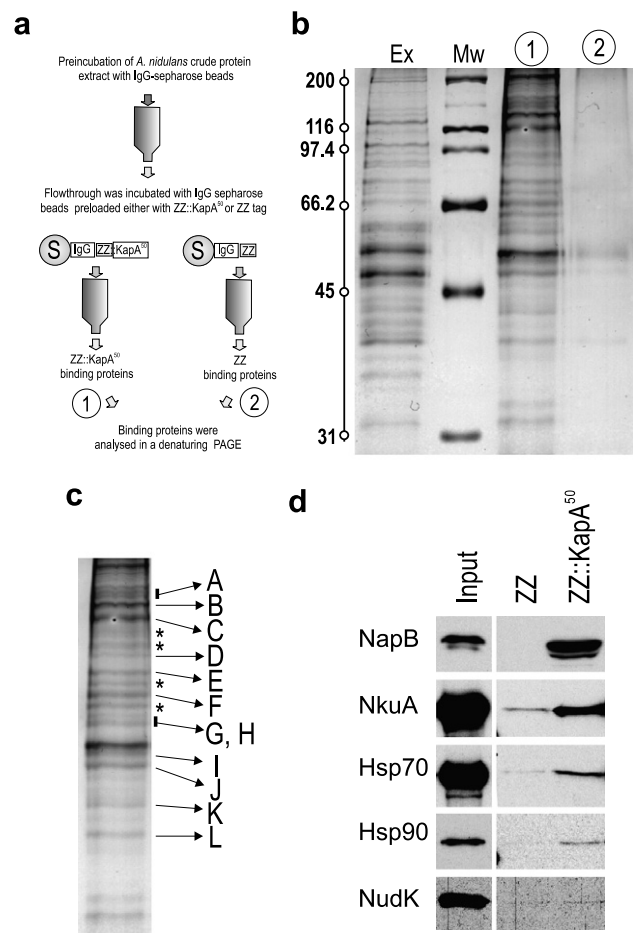


Fig. 1. Affinity column purification of KapA binding proteins. (a) Schematic representation of the protocol. (b) SDS-PAGE of the KapA binding proteins retained by the KapA⁵⁰ affinity column. Ex, 25 μ g of *Aspergillus nidulans* total protein extract. Lanes 1 and 2 are the eluates from the ZZ::KapA⁵⁰ and ZZ columns, respectively (see also panel a). Molecular weights of the standards are given in kDa. (c) The same lane 1 as in (b) showing the bands which have been identified by MS, indicated with capital letters (see also [Table 1](#)). (d) *In vitro* interaction analysis of bacterially expressed ZZ and ZZ::KapA⁵⁰ loaded onto IgG-sepharose with *in vitro* radioactive labeled proteins NapB (AN8170.3), NkuA (AN71298.3), Hsp70 (AN5129.3), Hsp90 (AN8269.3), and NudK (AN1953.3). Images correspond to different times of exposure for each pull down experiment. Coomassie gel staining was done to ensure equal amounts of ZZ and ZZ::KapA⁵⁰ were bound to the resin (not shown). Input lane for each [³⁵S]-methionine labeled protein is as follows: 1/5 of NapB, NkuA and Hsp70 and 1/2 of Hsp90 and NudK of the amount of TNT reaction used in the pull down assay.

ZZ-KapA⁵⁰ was used as bait in affinity purification experiments of *A. nidulans* protein extracts which had been pre-treated with IgG-Sepharose to minimize non-specific binding. Bound proteins were analyzed by SDS–PAGE and silver staining (Fig. 1b). A similar control experiment using IgG-sepharose-ZZ was run as a control. Comparison of ZZ-KapA⁵⁰ and ZZ eluates showed a repetitive pattern of bands for the ZZ-KapA⁵⁰ affinity column (Fig. 1b). Protein bands selected from silver stained SDS–PAGE gel were digested with trypsin and the resulting peptide mixture were analyzed by MS. Proteins were identified after comparison of their MS pattern to the predicted trypsin digests of the *A. nidulans* protein database. Out of the 16 bands that we analyzed, we were able to identify the corresponding protein in 12 cases (Fig. 1c and Table 1 and see below) while we could not find a convincing candidate in four (indicated with asterisks in Fig. 1c).

Bands ‘J’ and ‘L’ in Fig. 1b, corresponding to EF-1A and an acidic 60S ribosome subunit, respectively, were found in both eluates and thus represent non-specific binding. Other bands corresponding to almost certain non-specific binders are ‘D’ (translation elongation factor EF-2), ‘B’ (UDP-glucose protein glucosyl transferase) and two bands corresponding to metabolic enzymes glutamate dehydrogenase and folic acid synthetase (‘C’ and ‘K’, respectively). Finally, bands ‘E’ and ‘F’ correspond to the *A. nidulans* Hsp90 and Hsp70 orthologues (AN8269.3 and AN5129.3, respectively, Table 1). Although these are known chaperones associating with *de novo* synthesized polypeptides which have been reported to bind non-specifically to affinity columns loaded with protein baits, they play an additional, important role in the nuclear import and cytoplasmic transport of proteins (Pratt et al., 2004) and thus cannot be ruled out as *bona fide* KapA interactors (see below).

The remaining four proteins are convincing candidates for physiological interactors of KapA. Band ‘A’ is the AN1413.3 product, which is annotated as a 3'-UTR mRNA cleavage and polyadenylation specific protein. Band ‘G’ is NudK (Xiang et al., 1999), the *A. nidulans* Arp1p (actin related protein 1) orthologue and thus a component of cytoplasmic dynein. Two other proteins, AN7753.3 and AN8170.3 (bands ‘H’ and ‘I’, respectively, Table 1) are likely to be associated with DNA. The

AN7753.3 product has been recently identified as the *A. nidulans* 70 kDa subunit from the heterodimeric helicase Ku70/Ku80, and denoted *nkuA*. The fourth of these proteins, the AN8170.3 product, has not been investigated previously. It shows convincing similarity to Vps75p, a nuclear protein (Huh et al., 2003) paradoxically required for normal sorting of carboxypeptidase Y to the yeast vacuole (Bonangelino et al., 2002) and that has been recently described to have nucleosome assembly function, binding specifically H3H4 heterodimers (Selth and Svejstrup, 2007).

To confirm the interactions previously described, we performed yeast two-hybrid analysis. cDNA from the different candidate genes (bands E, F, G, H, and I) was amplified and cloned into the pGBKT7 plasmid to be used as baits at the two-hybrid assay. As prey the Gal4 activation domain fused to KapA⁵⁰ was used (Stinnett et al., 2007). Having the reported VeA–KapA⁵⁰ interaction as control (Stinnett et al., 2007), we could not detect *ex vivo* interactions either using β -galactosidase or growth test (HIS3 and ADE2) reporters (results not shown). In view of these results we carried out *in vitro* protein–protein interaction assays using *in vitro* synthesized proteins expressed from the pGBKT7 derivative vectors and as a bait IgG bound ZZ or ZZ-KapA⁵⁰ resin. As shown in Fig. 1d we were able to detect interaction of ZZ::KapA with NkuA, Hsp90/AN8269.3, Hsp70/AN5129.3 and AN8170.3, but not with NudK. Our *in vitro* protein–protein interacting results contrast with the absence of detectable interaction using the yeast-two hybrid system. We know that Gal4pAD-KapA⁵⁰ is competent for interaction, i.e., with VeA (Stinnett et al., 2007), so it is formally possible that the bait proteins are either not properly folded or the presence of the Gal4p DNA binding domain prevents these interactions. These data validate the previous interaction selection using total protein extracts from *A. nidulans*, although with respect to NudK it is reasonable to suppose that additional proteins may be required for mediating the interaction with KapA.

Hsc82p, one of the two *S. cerevisiae* Hsp90s, has been shown to be a TAP interactor of Srp1p (importin α) (Zhao et al., 2005), in this work we show that *A. nidulans* Hsp90/AN8269 is also competent for binding to importin α . Yeast Ssa1p/Hsp70 interacts with Srp1p/importin α through a surface in the vicinity of the IBB domain, bridging the

Table 1
Putative physiological interactors of *A. nidulans* importin α

Band	<i>A. nidulans</i> protein number	M_r (Da)	Gene	Peptides (prot. coverage) ^a
A	AN1413.3	147,851	Putative cleavage and polyadenylation specific protein	10 (9)
E	AN8269.3	79,818	Heat Shock 90	13 (20)
F	AN5129.3	70,045	Heat Shock 70	12 (23)
G	AN1953.3	43,198 ^b	Actin related protein 1, NudK	5 (17)
H	AN7753.3	71,298 ^b	ATP-dependent DNA helicase II, 70 kDa subunit (Ku70) superfamily, hypothetical protein	5 (11)
I	AN8170.3	40,849 ^b	NAP/SET family protein	5 (16)

^a Percentage of the KapA interacting protein covered by the identified peptides.

^b Proteins with abnormal electrophoretic mobility compared with the predicted molecular weight.

interaction of importin α with certain cargoes (Shulga et al., 1996); such interaction may also occur between KapA⁵⁰ and Hsp70/AN5129.3.

The Ku70/Ku80 heterocomplex is involved in the non-homologous end-joining repair pathway (Boulton and Jackson, 1998; Nayak et al., 2006; Ninomiya et al., 2004). The ability of human importin α to bind both subunits of the Ku70/Ku80 heterodimer has been described and agrees with the presence in each of a classic bipartite NLS (cNLS) (Song et al., 2003). However, the *A. nidulans* Ku70 orthologue, NkuA, does not contain an obvious cNLS, suggesting that it does not interact with KapA as a canonical cNLS-containing cargo.

In view of the facts that Nap/SET proteins are known interactors of mitotic B-type cyclins (Kellogg et al., 1995) and that in *S. cerevisiae* a genetic interaction has been described between *SRP1* and *CDC28*, encoding the catalytic subunit of the major cyclin-dependent kinase (Loeb et al., 1995), we have concentrated our efforts on the characterization of the AN8170.3 gene, that we denoted *napB*, and the second member of this family in *A. nidulans*, *napA*.

3.3. AN8863.3 and AN8170.3 are members of the Nap/SET family

The AN8170.3/NapB contains a PF00956 NAP domain characterizing the Nap, (nucleosome assembly proteins)/SET protein family (reviewed in Park and Luger, 2006a). As determined by database searching using the NAP domain (PF00956), the *A. nidulans* proteome has another Nap/SET protein, the product of AN8863.3, which is the orthologue of *S. cerevisiae* Nap1p (Supplementary Figs. 2A and 3) and that we denoted *napA*. Nap1p, a histone chaperone and chromatin remodeling factor and the best characterized member of this family (Kellogg and Murray, 1995; Park and Luger, 2006a; Park et al., 2005), shuttles histones from the cytoplasm to the nucleus (Miyaji-Yamaguchi et al., 2003; Mosammaparast et al., 2002, 2005).

We PCR-amplified and sequenced genomic and cDNA versions of AN8170.3/*napB* and AN8863.3/*napA*. Their comparison confirmed the intron/exon organization predicted by the automatic annotation tools for most of introns, with the sole exception of intron 3 in *napA* nucleotide sequence (see Genbank entry EF592166), and the presence of a PFAM PF00956 domain covering 64% of NapA and almost 85% of NapB amino acid sequences, respectively (Supplementary Fig. 3B and C). NapA shares 58% similarity with yeast Nap1p and shows amino acid sequence conservation in functional motifs/regions and secondary structure elements corresponding to those described in the Nap1p crystal structure (Park and Luger, 2006b), including the nuclear localization (NLS) and the nuclear export (NES) sequences (Supplementary Fig. 3). NapB shows lower overall conservation with the other Nap/SET protein family members, but it is actually more similar in amino acid sequence to human SET (26% simi-

larity) than to human or yeast Nap1p (23% and 21% similarity, respectively).

Nap1p shuttles between the nucleus and the cytoplasm by means of the above mentioned NLS and NES. The activity of the NES is modulated by the regulatory subdomain B, involving α -helix 3 in the crystal structure (Park and Luger, 2006b). Its NLS motif is recognized by the Kap114p importin (Mosammaparast et al., 2005), of which this protein is a demonstrated cargo. SET proteins, NapB and Vps75p lack these nuclear transport elements characteristic of Nap1p and its metazoan orthologues (Park and Luger, 2006a; Selth and Svejstrup, 2007) which, together with sequence similarity data, suggests that Vps75p and NapB are the fungal relatives of SET proteins from higher eukaryotes. The absence of the conserved Nap1p-NLS additionally suggest that NapB and Vps75p might use a Kap114p-independent nuclear import pathway, possibly depending on importin α KapA, as indicated by our affinity purification experiment.

3.4. NapB specifically interacts with Importin α

To study further the interaction detected between NapB and KapA in affinity columns, we used pull down assays with bacterially expressed proteins. Protein extracts from *E. coli* cells expressing either GST::NapB or ZZ::KapA⁵⁰ were incubated with IgG-sepharose. As expected, ZZ::KapA⁵⁰ but not GST::NapB, was retained by the resin (Fig. 2a, lanes 7 and 8). In contrast, when both extracts were mixed, GST::NapB was pulled down by IgG-sepharose loaded with ZZ::KapA⁵⁰, but not when loaded with the ZZ polypeptide (Fig. 2a, lanes 4 and 6). Similar results were obtained when GST-NapB was used as a bait under conditions in which GST alone did not show any interaction with either ZZ or ZZ-KapA⁵⁰ (data not shown). Thus, these pull down assays represent corroborating evidence of the interaction between *A. nidulans* importin α and NapB.

The specificity of these assays was confirmed. Additional pull down experiments were performed using purified *E. coli* expressed proteins GST::NapA, GST::NapB, and GST::PacC(305–678) (Fig. 2b lanes 4, 5, and 6, respectively). PacC(305–678) has no cNLS-like sequence and is not imported into the nucleus (Mingot et al., 2001a). In contrast to GST::NapB, neither GST::NapA nor GST::PacC(305–678) were pulled down by ZZ-KapA⁵⁰ (see Fig. 2b). Specific binding of NapB to importin α agrees with its nuclear localization (see below). As Nap1p, the *S. cerevisiae* NapA orthologue, is transported into the nucleus by Kap114p (Mosammaparast et al., 2001) and the NLS is not conserved between Nap and SET proteins, these data strongly suggest that nuclear import of different fungal Nap/SET family members might involve different carriers. To verify this hypothesis we characterized the *A. nidulans* Kap114p homologue. We did a Blastp search using the yeast Kap114p sequence and the *A. nidulans* protein database (<http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/>). We found one protein encoded by the gene

AN2163.3 with 43% similarity to the yeast Kap114p (Supplementary Fig. 4). The gene AN2163.3 is an intron-less nt sequence, we denoted *kapG*. Then, we tested whether GST::NapB and GST::NapA are able to interact with *in vitro* expressed KapG using pull down assays with glutathione-sepharose preloaded with the fusion proteins. As control we included KapA⁵⁰ and the *A. nidulans* importin β 1, KapB (Osmani et al., 2006). Yeast importin β 1, Kap95p, does not interact with Nap1p (Mosammamparast et al., 2002). We detected the interaction between NapB and KapA, and confirmed the absence of interaction of KapA with NapA (Fig. 3, upper image). Unexpectedly no interaction could be detected by using either NapA or NapB with KapG, even when we used the assay conditions where the interaction between GST::Nap1p and Kap114p was analyzed (Mosammamparast et al., 2002) (Fig. 3, middle image). The absence of interaction between NapB and

KapB (Fig. 3 lower image) confirms the specific recognition of NapB by KapA. These results are in agreement with our previous hypothesis that the nuclear import machinery involved in the transport of the *A. nidulans* Nap/SET proteins might differ from that described in other organisms, at least in the yeast *S. cerevisiae* (see also below).

3.5. NapB is a nuclear protein in *A. nidulans*

In view of the specific interaction of NapB with the nuclear carrier importin α , we determined the subcellular localization of NapB. We tagged NapB with the green fluorescent protein using the method described by Yang et al. (2004) (Fig. 4a). Transformants carrying a gene replacement event of *napB* by *napB::GFP* were selected and analyzed by epi-fluorescent microscopy. In agreement with its interaction with importin α , NapB::GFP shows predominant, almost exclusive, nuclear localization in interphase (Fig. 4b).

We have previously utilized *S. cerevisiae* to prove a physiological role of importin α in the nuclear transport of two *A. nidulans* proteins, PacC and VeA (Fernandez-Martinez et al., 2003; Stinnett et al., 2007). Using a centromeric plasmid we expressed a GFP::NapB fusion in the wild type strain W303-1a driven by the ADH1 promoter (Fernandez-Martinez et al., 2003). In contrast to the nuclear localization described for GFP tagged Vps75p (Huh et al., 2003), GFP::NapB is not nuclear in *S. cerevisiae* (Fig. 4c). One possible explanation might be the absence of functionality of NapB NLS in the yeast; this has been previously reported for PacC, where the NLS located in the zinc finger region is not functional in *S. cerevisiae* (Fernandez-Martinez et al., 2003). The fact that the

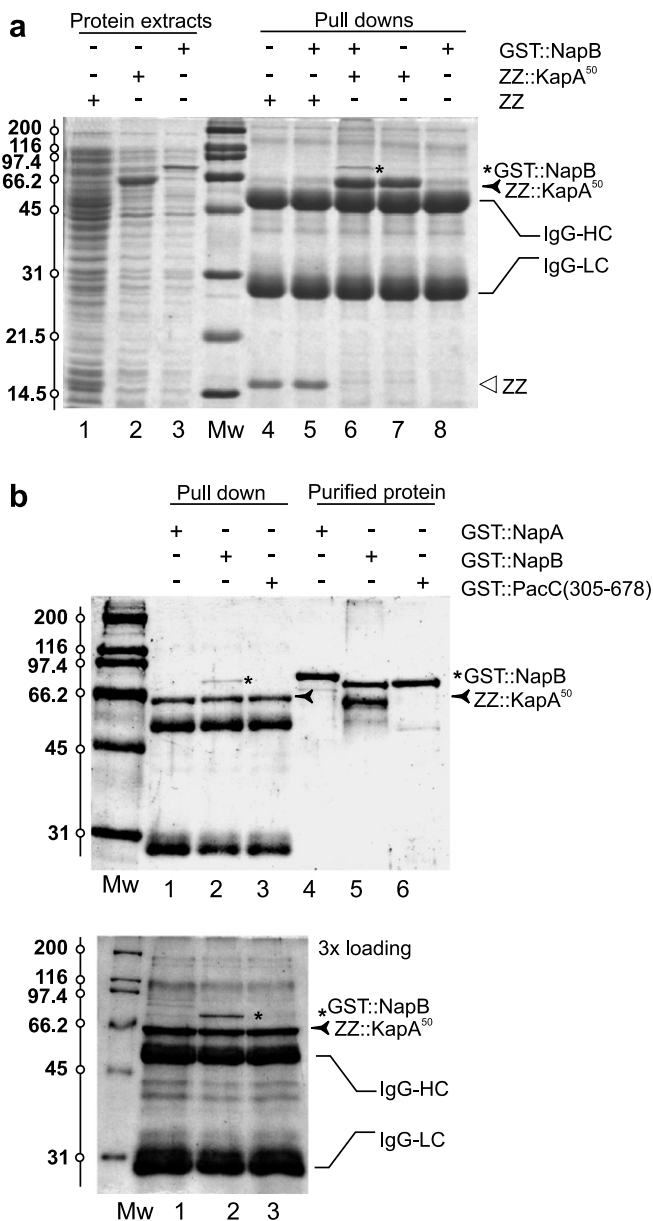


Fig. 2. KapA⁵⁰ specifically interacts with NapB in pull down assays. (a) The halftone shows a Coomassie staining of a 12% SDS-PAGE of total *E. coli* extracts (lanes 1–3) or pull down assays in which protein extracts were incubated with IgG-sepharose, beads were recovered by centrifugation, washed and boiled in loading buffer (lanes 4–8). Lane 1, extract from cells expressing the ZZ domain alone; lane 2, extract from cells expressing ZZ::KapA⁵⁰; lane 3, extract from cells expressing GST::NapB (lane 3); lane 4, pull down assay using the ZZ extract alone; lane 5, pull down assay using the ZZ extract mixed with and equivalent amount of the GST::NapB extract; lane 6, pull down assay of the ZZ-KapA⁵⁰ extract mixed with an equal amount of the GST-NapB extract; lane 7, pull down assay using the ZZ-KapA⁵⁰ extract alone; lane 8, pull down assay using the GST-NapB extract alone. (b) Pull down assays showing the interaction between KapA⁵⁰ and NapB using KapA⁵⁰-loaded IgG resin and purified GST fusion protein baits. Lanes 4, 5, and 6 contain 1/10 of the input corresponding to GST::NapA, GST::NapB and GST::PacC(305–678), respectively. Lane 1, pull down assay using GST-NapA. Lane 2, pull down assay using GST-NapB. Lane 3, pull down assay using GST-PacC(305–678). The prominent bands in panels (a) and (b) correspond to the IgG heavy (IgG-HC) and light (IgG-LC) chains. NapB migrates as a 50 kDa protein (Fig. 1, band I) which contrasts with its predicted *M_r* of 40.8 kDa, and the 66.8 kDa GST::NapB fusion protein migrates as a ~72 kDa band. Similar discrepancies between predicted and observed mobility have been reported for yeast and vertebrate Nap/SET proteins (Ishimi and Kikuchi, 1991; Kellogg et al., 1995; Navadgi et al., 2006), almost certainly resulting from the abnormally high proportion of acidic residues (27% aspartate or glutamate in the case of NapB).

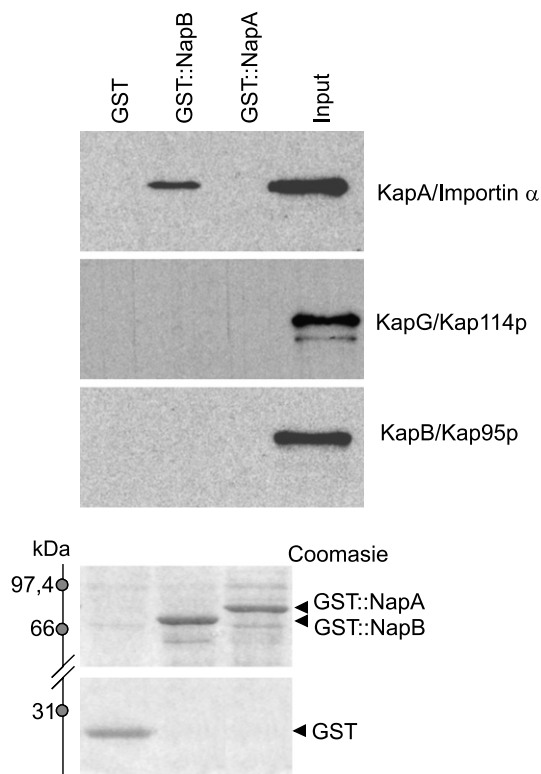


Fig. 3. KapG, the *A. nidulans* Kap114p homologue, does not interact with NapA or NapB. Immobilized GST, GST::NapA, and GST::NapB proteins were incubated with each of the three *in vitro* translated nuclear import carriers, KapA⁵⁰, KapB (GenBank AAP57941), and KapG, following the procedures described in Mosammaparast et al. (2002). Input labeled track contains 1/3 of the amount of TNT reaction used in each experiment. A representative Coomassie stained gel showing loading of each GST fusion proteins is displayed at the bottom.

Kap114 homologue KapG does not interact with either NapB or NapA suggests, at least for NapB, that major differences may exist in the mechanisms governing the import of these proteins in these two fungi.

3.6. *NapB* is cytoplasmic during mitosis

Nap/SET proteins typically show regulation at the level of nucleo-cytoplasmic trafficking, which accounts for the dual localization, in the cytosol and in the nucleus, reported for several of these proteins. For example, yeast Nap1p (Miyaji-Yamaguchi et al., 2003) and their plant homologues (Dong et al., 2005) shuttle between the nucleus and the cytoplasm due to the antagonizing roles of a NLS and a NES. Regulation of subcellular localization of Nap/SET proteins often occurs in a cell cycle-dependent manner (Ito et al., 1996; Marheineke and Krude, 1998; Rogner et al., 2000). For example, human NAP-2 and *Drosophila* NAP1 are nuclear during the S phase, in agreement with their role in nucleosome assembly, and cytosolic in G2 (Ito et al., 1996; Rogner et al., 2000). Thus, we followed the subcellular localization of *A. nidulans* NapB::GFP *in vivo*.

Aspergillus nidulans, like other fungi, undergoes a closed mitosis, where the nuclear membrane remains intact

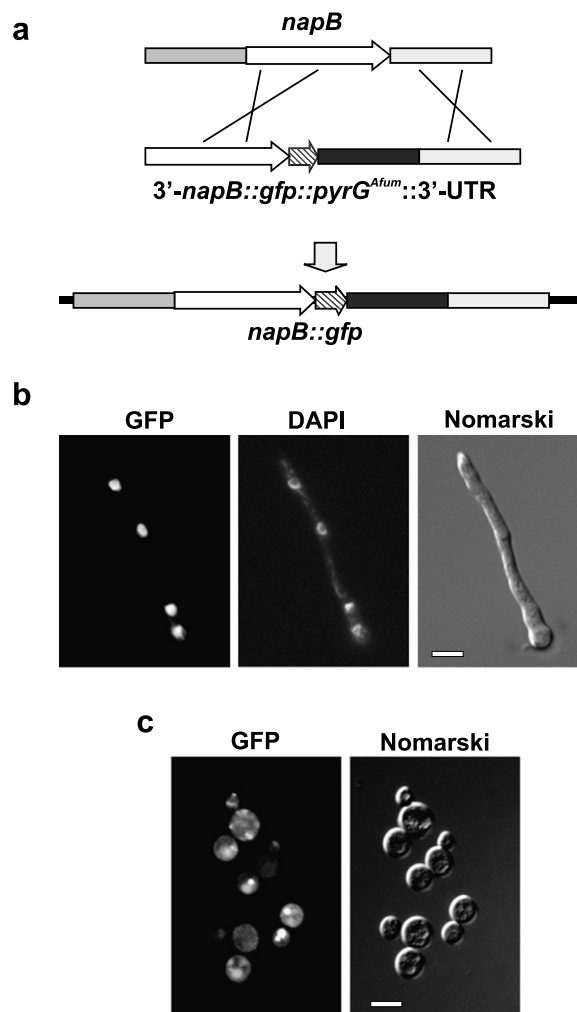


Fig. 4. GFP-tagging and subcellular localization of NapB. (a) Scheme showing the double cross-over strategy used to tag NapB with GFP. The cassette 3'*napB::gfp::pyrG^{Afum}::3'-UTR* was amplified using the technique described in Yang et al. (2004). (b) Nuclear localization of NapB::GFP in interphase (GFP). Nuclei stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) are shown. (c) GFP::NapB expression in yeast shows cytoplasmic and vacuolar distributions (GFP). Nomarski images of both germling and the yeast cells are depicted on the right side of each panel. The scale bar represents 5 μ m.

throughout the cell cycle. However, nuclear pore complexes are partially disassembled during mitosis, which allows passage of proteins in a Ran gradient-independent, and thus karyopherin-independent, manner, suggesting that, during mitosis, the subcellular localization of proteins is dictated by their relative binding affinities to other subcellular components (De Souza et al., 2004). Fig. 5a shows frames taken from Supplementary movie 1, demonstrating that NapB::GFP, which exhibits preferential nuclear localization in non-mitotic nuclei (Fig. 4b), is released to the cytosol at the onset of mitosis and is re-imported into the nuclei after mitosis, when the Ran-GTP gradient is re-established (De Souza et al., 2004). In marked contrast, the zinc-finger transcription factor PacC²⁷ (Fernandez-Martinez et al., 2003; Penalva and Arst, 2004) is retained

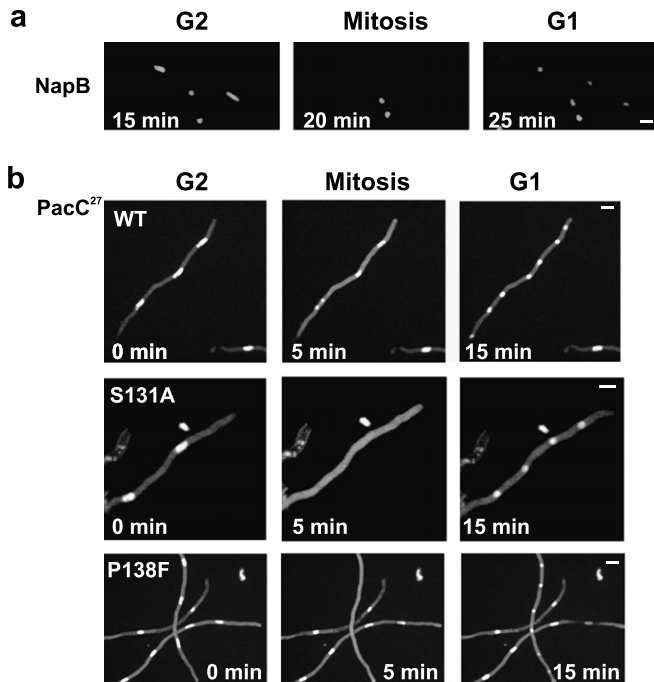


Fig. 5. Cytosolic localization of NapB during mitosis. (a) Frames from [Supplementary movie 1](#) showing the nuclear localization of NapB-GFP in G2 is lost during mitosis and recovered after mitosis completion (G1). (b) Frames from [Supplementary movies 2, 3, and 4](#) corresponding to strains expressing wild type GFP::PacC²⁷ (WT, encoded by *pacC700*) and its single residue substitution mutants S131A (*pacC⁺-70004*) P138F (*pacC⁺-70015*). Ser131Ala and Pro138Phe substitutions within the zinc-finger region of PacC²⁷ abolish DNA binding but do not impair nuclear import (Fernandez-Martinez et al., 2003). During mitosis these two GFP::PacC²⁷ mutant fusion proteins localize to the cytoplasm. They recover their nuclear localization after mitosis is completed, similarly to NapB. The scale bar represents 5 μm.

in the mitotic nuclei through its ability to bind DNA, as demonstrated by the cytosolic localization of mutant PacC²⁷ forms carrying Ser131Ala or Pro138Phe substitutions, which impair DNA binding (Fig. 5b) (Fernandez-Martinez et al., 2003). These data additionally indicate that NapB does not bind chromatin during mitosis (see below). Exclusion of NapB from mitotic nuclei would facilitate a putative cytosolic role, such as that demonstrated for its yeast Vps75p *S. cerevisiae* orthologue (Bonangelino et al., 2002).

3.7. Nuclear localization of NapB during interphase is energy independent

The above data showed a dramatic change in the nuclear localization of NapB during mitosis, when active nuclear import is counteracted by partial NPC disassembly. To impair nuclear transport during interphase we used energy depleting conditions. Nuclear localization of wild type PacC²⁷ was unaffected after incubation in medium containing a mixture of azide and sodium fluoride (Fig. 6b). In contrast, mutant Pro138Phe PacC²⁷ was released to the cytoplasm (Fig. 6c), in agreement with the above results

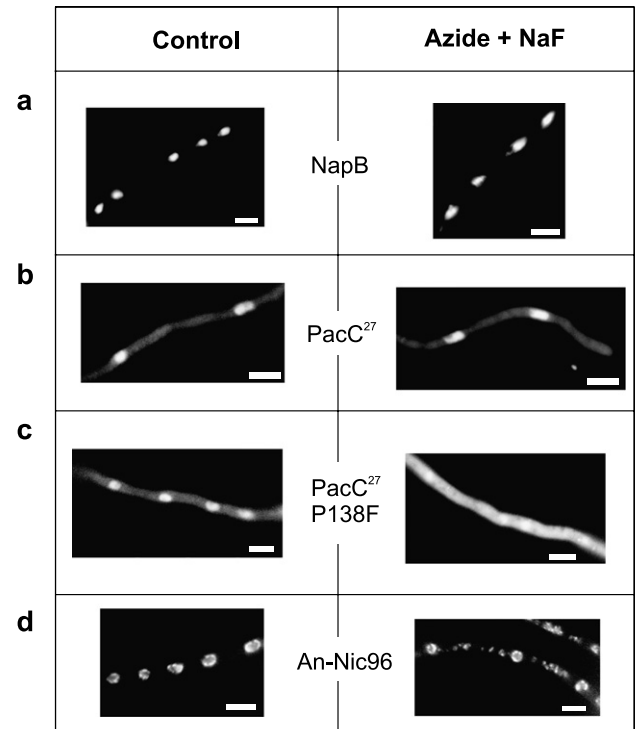


Fig. 6. Effect of energy depletion in the localization of NapB::GFP. Cells expressing the indicated fusion proteins were incubated in the presence of 15 mM azide and 15 mM NaF and the localization of the fluorescent protein fusions examined in nuclei that were not undergoing mitosis. (a) Nuclear localization of NapB::GFP in non-mitotic nuclei is not affected by the treatment. (b) Localization of wild type GFP::PacC²⁷. (c) Loss of nuclear localization of P138F GFP::PacC²⁷, impaired in DNA binding. This control convincingly demonstrates that the conditions used impair nuclear import. (d) Localization of the An-Nic96::GFP nucleoporin. The scale bar represents 5 μm.

showing the strict requirement of DNA binding for nuclear retention of PacC²⁷ when the NPC is partially disassembled. Notably, the preferential nuclear localization of NapB::GFP (Fig. 6a) remained unchanged under these conditions, indicating that NapB might be also retained into the nuclei, possibly by binding to chromatin. We determined, as additional control, the localization of the An-Nic96::GFP chimera. An-Nic96 is a component of the NPC that gives name to a subcomplex of structural nucleoporins (the Nup93/Nic96 subcomplex) (see Tran and Wente, 2006, and references therein) which has been shown to be released from the nuclear envelope during mitosis in *Aspergillus* (see Fig. 5, video 17 from reference Osmani et al., 2006). As it is shown in Fig. 6d, the perinuclear localization of An-Nic96 in interphase is essentially energy independent.

Overall these experiments strongly suggest that during interphase nuclear localization of NapB is mainly determined by its affinities or interactions within the nucleus and, interestingly, during mitosis posttranslational modifications might occur to prevent the nuclear retention of NapB in addition to the loss of an active nuclear import pathway.

3.8. *NapB* and the cyclin *B* *NimE* compete for *in vitro* binding to importin α

Nap/SET family members are known interactors of B-type cyclins (Kellogg et al., 1995; Kellogg and Murray, 1995), consequently we studied the possibility that one of the nuclear functions of NapB would be to help importin α to mediate nuclear import of NimE, the unique B-type cyclin characterized in *A. nidulans* (O'Connell et al., 1992). We expressed *in vitro* a radioactive NimE protein and we did pull down assays using ZZ and ZZ::KapA⁵⁰ loaded IgG resins. As is shown in Fig. 7a, NimE interacts

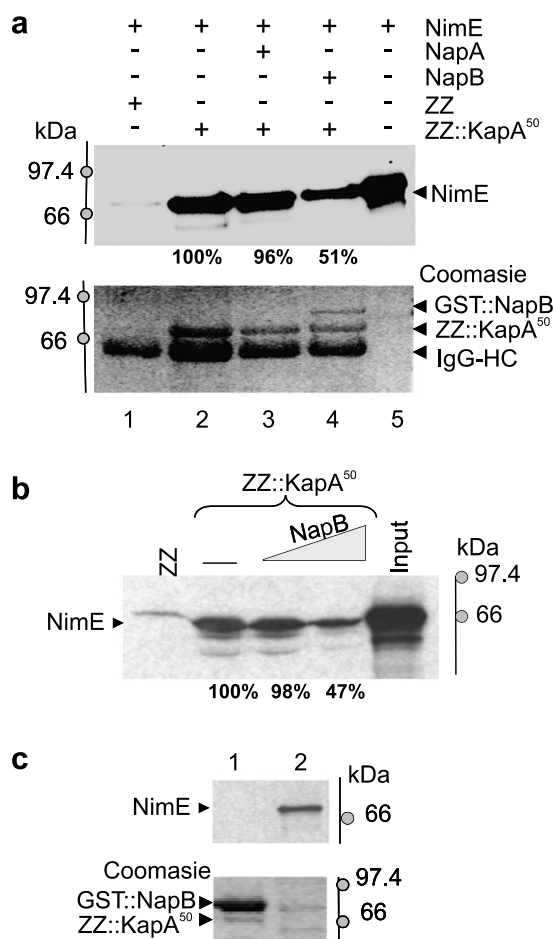


Fig. 7. *In vitro* interaction of KapA and NimE. (a) Immobilized ZZ, lane 1, or ZZ::KapA, lanes 2–4, were incubated with *in vitro* translated NimE, and the effect of adding either GST::NapA, lane 3, or GST::NapB, lane 4, to the pull down assay was analyzed. Percentages shown under NimE pull down measure the intensity of NimE bands at lanes 2, 3, and 4. Intensity of NimE band at lane 2 as was considered as 100% KapA–NimE interaction. The Coomassie staining of the SDS–PAGE gel is shown underneath. (b) NapB competes with NimE binding to KapA. Twenty and 100 μ l of *E. coli* protein extract expressing GST::NapB were added to the NimE–ZZ::KapA⁵⁰ binding reaction. Below the image is shown a quantification of each NimE band having as 100% that measured in the reaction without GST::NapB. (c) Pull down assay using as bait glutathione-sepharose immobilized GST::NapB and a mixture of *E. coli* protein extract expressing ZZ::KapA⁵⁰ and *in vitro* translated NimE, lane 1. Lane 2 contains 1/3 of the loading of NimE to the pull down assay. At the bottom is shown the Coomassie staining of the SDS–PAGE gel.

with the importin α , despite the absence of a classical NLS in its amino acid sequence (Fig. 7a, compare lanes 1 and 2). However, no interaction was detected between NimE and GST::NapA or GST::NapB (results not shown). In view of this unexpected result we did pull down assays using the ZZ::KapA⁵⁰ loaded IgG resin and a mixture of NimE and each of the GST::NapA or GST::NapB fusion proteins. As mentioned before, GST::NapA does not interact with ZZ::KapA⁵⁰ and in addition does not alter the recent interaction with NimE (Fig. 7, lane 3), in contrast the presence of GST::NapB in the pull down assay caused a reduction of NimE retention (approx. 50%) by the IgG–ZZ::KapA⁵⁰ loaded resin (Fig. 7, lane 4). Competition to NimE binding of ZZ::KapA⁵⁰ was further confirmed with pull down experiments adding different concentrations of GST::NapB (Fig. 7b), suggesting that importin α binds NimE and NapB through the same region. A pull down assay using glutathione-sepharose loaded with GST::NapB and a mixture of NimE and ZZ::KapA⁵⁰ confirmed the lack of formation of a KapA–NimE–NapB heterotrimer *in vitro*, although ZZ::KapA⁵⁰ was retained in the experiment by NapB as expected (Fig. 7c, lane 1). Taken together, these data indicate that the B-type cyclin NimE is another putative cargo of KapA and the Nap/SET family members in *A. nidulans* are not competent to bind to or help the importin α in recognizing and binding to NimE *in vitro*.

4. Discussion

KapA is the only gene encoding an importin α in the filamentous fungus *A. nidulans*. We used KapA⁵⁰, a deleted version of KapA lacking the IBB domain, as bait in affinity experiments, in an attempt to isolate interacting proteins potentially mediating the large number of roles attributed to this general nuclear import receptor. With the exception of the NAD⁺-specific glutamate dehydrogenase, none of the interacting proteins contains a classical NLS motif, suggesting that their interaction with KapA⁵⁰ is either indirect or, if direct, it is mediated through a KapA⁵⁰ surface/residues other than that/those involved in binding classical NLSs.

We demonstrate that NapB, the likely *A. nidulans* orthologue of yeast Vps75p, is a specific interactor of KapA⁵⁰. NapB and Vps75p are members of the Nap/SET family of histone chaperones, which includes yeast Nap1p and its orthologues, conserved from fungi to humans (Park and Luger, 2006a), as well as metazoan SET proteins, to which we propose that NapB and Vps75p are related.

A putative role has been proposed for metazoan SET proteins in chromatin organization. Human SET recruits the cyclin-B–CDK1 complex to promote histone H1 modification (Canella et al., 2003). The role of SET proteins as histone chaperones and chromatin remodeling factors has been reported for *Plasmodium* PfNapS, whose highly acidic carboxyl terminus has been shown to be specifically involved in the recognition of H1, with other regions binding to H3/H4 with high affinity (Navadgi et al., 2006).

While the association of *S. cerevisiae* Nap1p with histones and its role as chromatin remodeling factor is well established (Park et al., 2005), the nucleosome assembly activity and the ability of Vps75p to bind histone H3/H4 tetramers has only recently been demonstrated (Selth and Svestrup, 2007). In addition to its role as histone chaperone, *S. cerevisiae* Nap1p helps nuclear import of histones H2A and H2B. The NLS in Nap1p is recognized by Kap114p and Nap1p bridges a heteromeric complex containing histones and the Kap114p importin which increases the affinity of Kap114p for the H2A and H2B NLSs (Mosammamaparak et al., 2002, 2005). Our finding that NapB shows nuclear localization in non-mitotic nuclei, when the Ran-dependent machinery is strictly required for nuclear import in *A. nidulans* (De Souza et al., 2004), raises the possibility that NapB and other SET proteins play a hypothetical role as nuclear import helpers. Histones would be obvious candidates for potential cargoes. Vps75p specifically binds the H3/H4 histone tetramer (Selth and Svestrup, 2007), although neither the nature of the interaction nor its role in H3/H4 nuclear import has been determined. Other potential candidates are regulators of the cell cycle. Human SET prevents cell cycle progression at the G2/M transition by inhibiting cyclin B–CDK1 activity through its direct interaction with cyclin B and the CDK inhibitor p21^{Cip1} (Canela et al., 2003).

The absence in NapB, Vps75 and other SET proteins of the nuclear localization sequence that recognizes Kap114p in Nap1p and the fact that NapB does not interact *in vitro* with KapG, the *A. nidulans* Kap114p putative orthologue, strongly suggests that a different carrier mediates the nuclear import of the SET-like proteins. We show here that importin α is a strong candidate to be such a carrier, although the participation of other nuclear importers cannot be ruled out. All three putative KapA binding cargoes that have been characterized in *A. nidulans*, PacC, VeA, and StuA, contain consensus classical bipartite NLSs (De Souza et al., 2004; Fernandez-Martinez et al., 2003; Fontes et al., 2000; Stinnett et al., 2007; Suelmann et al., 1997). NapB has no apparent bi- or mono-partite classical NLS suggesting that studies on the interaction between NapB and KapA may provide with new insights on the recognition by importin α of its cargoes.

Like the *A. nidulans* cyclin-dependent kinases PhoA and PhoB and the chimaeric fusion protein StuA-NLS-GFP, NapB exits the nucleus in mitosis, when the nuclear pore complexes are partially disassembled (De Souza et al., 2004; Suelmann et al., 1997). This is in stark contrast with PacC, which we show to be retained in mitotic nuclei through its DNA binding ability. Thus, the fact that NapB exits the nucleus during mitosis strongly suggests that, during this process, NapB is not retained in this compartment by interaction with any nuclear component. In contrast, NapB remains nuclear in interphase when nuclear import is compromised, indicating that NapB binds a nuclear component, possibly chromatin. Involvement of the histone chaperone Vps75p in vacuolar protein sorting (Bon-

angelino et al., 2002) shows that this protein plays non-nuclear functions. The transient cytoplasmic localization of its *A. nidulans* orthologue NapB would help to explain its roles in different subcellular compartments.

The conclusion that importin α but not NapA and NapB is interacting with the B-type cyclin NimE is very suggestive in view of the fact that Nap (Nap1p) and SET proteins are interactors of mitotic B-type cyclins (Archambault et al., 2004; Canela et al., 2003; Kellogg et al., 1995). NimE is the orthologue of Clb2p and the only cyclin-B characterized in *A. nidulans* (O'Connell et al., 1992), although our unpublished work has revealed the existence of an additional cyclin B in the *A. nidulans* genome. Future work will reveal if NapA and NapB are able to interact with this as yet uncharacterized B-type cyclin and have a role in cell cycle regulation. NimE nuclear import has been shown to be dependent on the activity of NimA, one of the serine/threonine protein kinases required for the onset of mitosis, and also on SonA, the Gle2p/Rae1p orthologue (Wu et al., 1998). However, the exact transport mechanism has not been already elucidated. Interestingly, both Clb2p and Gle2p/Rae1p are interactors of importin α /SRP1p (Archambault et al., 2004; Murphy et al., 1996). The competition of NimE and NapB for binding to KapA suggests a highly speculative hypothesis, where nuclear import of NimE could be regulated via binding competition to the importin α by SonA, thus, attributing to *A. nidulans* importin α a dual role in both nucleocytoplasmic transport and mitosis regulation. Future work involving isolation of conditional mutations affecting KapA and impairing nuclear transport will be required for physiological studies of its putative cargoes and determination its role in *A. nidulans* cell cycle regulation.

Acknowledgments

We thank Dr. Dirk Görlich for plasmid pQE80zz, Dr. Stephen Osmani for plasmid pGFP and help with confocal microscopy, J.C. Sánchez for help with the phylogenetic analysis, Prof. Herbert N. Arst Jr. for critical reading of the manuscript, Leire Paz for *kapG* cDNA cloning and E. Reoyo for technical assistance, and the Ministerio de Ciencia y Tecnología for support through Grants BFU2006-04185 to E.A.E. and BIO2006-0556 to M.A.P. J.F.-M. and L.A.-B. held a PFPI and a FPU fellowship, respectively.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.fgb.2007.08.003](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.08.003).

References

- Archambault, V., Chang, E.J., Drapkin, B.J., Cross, F.R., Chait, B.T., Rout, M.P., 2004. Targeted proteomic study of the cyclin–Cdk module. *Mol. Cell* 14, 699–711.

- Bonangelino, C.J., Chavez, E.M., Bonifacino, J.S., 2002. Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 13, 2486–2501.
- Boulton, S.J., Jackson, S.P., 1998. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J.* 17, 1819–1828.
- Canela, N., Rodríguez-Vilarrupla, A., Estanyol, J.M., Diaz, C., Pujol, M.J., Agell, N., Bachs, O., 2003. The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B–cyclin-dependent kinase 1 activity. *J. Biol. Chem.* 278, 1158–1164.
- Cove, D.J., 1966. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 113, 51–56.
- De Souza, C.P.C., Osmani, A.H., Hashmi, S.B., Osmani, S.A., 2004. Partial nuclear pore complex disassembly during closed mitosis in *Aspergillus nidulans*. *Curr. Biol.* 14, 1973–1984.
- Diez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suarez, T., Tilburn, J., Arst Jr., H.N., Penalva, M.A., 2002. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J.* 21, 1350–1359.
- Dong, A., Liu, Z., Zhu, Y., Yu, F., Li, Z., Cao, K., Shen, W.H., 2005. Interacting proteins and differences in nuclear transport reveal specific functions for the NAP1 family proteins in plants. *Plant Physiol.* 138, 1446–1456.
- Fernandez-Martinez, J., Brown, C.V., Diez, E., Tilburn, J., Arst, J., Penalva, M.A., Espeso, E.A., 2003. Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA-binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J. Mol. Biol.* 334, 667–684.
- Fontes, M.R., Teh, T., Kobe, B., 2000. Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin- α . *J. Mol. Biol.* 297, 1183–1194.
- Fried, H., Kutay, U., 2003. Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. *Cell Mol. Life Sci.* 60, 1659–1688.
- Goldfarb, D.S., Corbett, A.H., Mason, D.A., Harreman, M.T., Adam, S.A., 2004. Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.* 14, 505–514.
- Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R.A., Hartmann, E., 1996. A 41 amino acid motif in importin- α confers binding to importin- β and hence transit into the nucleus. *EMBO J.* 15, 1810–1817.
- Gorlich, D., Kutay, U., 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 607–660.
- Harreman, M.T., Hodel, M.R., Fanara, P., Hodel, A.E., Corbett, A.H., 2003. The auto-inhibitory function of importin α is essential in vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 5854–5863.
- Herold, A., Truant, R., Wiegand, H., Cullen, B.R., 1998. Determination of the functional domain organization of the importin α : a nuclear import factor. *J. Cell Biol.* 143, 309–318.
- Hood, J.K., Silver, P.A., 1998. Cse1p is required for export of Srp1p/importin- α from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 35142–35146.
- Hubner, S., Smith, H.M.S., Hu, W., Chan, C.K., Rihs, H.P., Paschal, B.M., Raikhel, N.V., Jans, D.A., 1999. Plant importin α binds nuclear localization sequences with high affinity and can mediate nuclear import independent of importin β . *J. Biol. Chem.* 274, 22610–22617.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S., O'Shea, E.K., 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691.
- Ishimi, Y., Kikuchi, A., 1991. Identification and molecular cloning of yeast homolog of nucleosome assembly protein I which facilitates nucleosome assembly in vitro. *J. Biol. Chem.* 266, 7025–7029.
- Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R., Kadonaga, J.T., 1996. Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3112–3124.
- Kellogg, D.R., Kikuchi, A., Fujii-Nakata, T., Turck, C.W., Murray, A.W., 1995. Members of the NAP/SET family of proteins interact specifically with B-type cyclins. *J. Cell Biol.* 130, 661–673.
- Kellogg, D.R., Murray, A.W., 1995. NAP1 acts with Clb2 to perform mitotic functions and to suppress polar bud growth in budding yeast. *J. Cell Biol.* 130, 675–685.
- Kobe, B., 1999. Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin α . *Nat. Struct. Biol.* 6, 388–397.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 5, 150–163.
- Loeb, J.D., Schlenstedt, G., Pellman, D., Kornitzer, D., Silver, P.A., Fink, G.R., 1995. The yeast nuclear import receptor is required for mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7647–7651.
- Marheineke, K., Krude, T., 1998. Nucleosome assembly activity and intracellular localization of human CAF-1 changes during the cell division cycle. *J. Biol. Chem.* 273, 15279–15286.
- Matsuura, Y., Stewart, M., 2004. Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* 432, 872–877.
- Mingot, J.M., Espeso, E.A., Diez, E., Penalva, M.A., 2001a. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1688–1699.
- Mingot, J.M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E., Gorlich, D., 2001b. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* 20, 3685–3694.
- Miyaji-Yamaguchi, M., Kato, K., Nakano, R., Akashi, T., Kikuchi, A., Nagata, K., 2003. Involvement of nucleocytoplasmic shuttling of yeast Nap1 in mitotic progression. *Mol. Cell. Biol.* 23, 6672–6684.
- Moore, M.S., 2003. Np60: a new player in nuclear protein import. *Trends Cell Biol.* 13, 61–64.
- Mosammaparast, N., Del Rosario, B.C., Pemberton, L.F., 2005. Modulation of histone deposition by the karyopherin kap114. *Mol. Cell Biol.* 25, 1764–1778.
- Mosammaparast, N., Ewart, C.S., Pemberton, L.F., 2002. A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B. *EMBO J.* 21, 6527–6538.
- Mosammaparast, N., Jackson, K.R., Guo, Y., Brame, C.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Pemberton, L.F., 2001. Nuclear import of histone H2A and H2B is mediated by a network of karyopherins. *J. Cell Biol.* 153, 251–262.
- Murphy, R., Watkins, J.L., Wente, S.R., 1996. GLE2, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* export factor RAE1, is required for nuclear pore complex structure and function. *Mol. Biol. Cell* 7, 1921–1937.
- Navadgi, V.M., Chandra, B.R., Mishra, P.C., Sharma, A., 2006. The two Plasmodium falciparum nucleosome assembly proteins play distinct roles in histone transport and chromatin assembly. *J. Biol. Chem.* 281, 16978–16984.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., Hynes, M.J., Osmani, S.A., Oakley, B.R., 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172, 1557–1566.
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., Inoue, H., 2004. From the cover: highly efficient gene replacements in Neurospora strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12248–12253.
- Notredame, C., Higgins, D.G., Heringa, J., 2000. T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302, 205–217.
- O'Connell, M.J., O'Connell, M.J., Osmani, A.H., Osmani, A.H., Morris, N.R., Morris, N.R., Osmani, S.A., Osmani, S.A., 1992. An extra copy of nimE/cyclinB elevates pre-MPF levels and partially suppresses mutation of nimTcdc25 in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 11, 2139–2149.
- Orejas, M., Espeso, E.A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst Jr., H.N., Penalva, M.A., 1995. Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* 9, 1622–1632.
- Osmani, A.H., Davies, J., Liu, H.L., Nile, A., Osmani, S.A., 2006. Deletion and mitotic localization of the nuclear pore complex proteins of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell*, E06–E07.

- Park, Y.J., Luger, K., 2006a. Structure and function of nucleosome assembly proteins. *Biochem. Cell Biol.* 84, 549–558.
- Park, Y.J., Luger, K., 2006b. The structure of nucleosome assembly protein 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 1248–1253.
- Park, Y.J., Chodaparambil, J.V., Bao, Y., McBryant, S.J., Luger, K., 2005. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding. *J. Biol. Chem.* 280, 1817–1825.
- Penalva, M.A., 2005. Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet. Biol.* 42, 963–975.
- Penalva, M.A., Arst, J., 2004. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 425–451.
- Pratt, W.B., Galigniana, M.D., Harrell, J.M., DeFranco, D.B., 2004. Role of hsp90 and the hsp90-binding immunophilins in signalling protein movement. *Cell. Signal.* 16, 857–872.
- Rogner, U.C., Spyropoulos, D.D., Le Novere, N., Changeux, J.P., Avner, P., 2000. Control of neurulation by the nucleosome assembly protein-1-like 2. *Nat. Genet.* 25, 431–435.
- Selth, L., Svejstrup, J.Q., 2007. VPS75—a new yeast member of the NAP histone chaperone family. *J. Biol. Chem.*
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Shulga, N., Roberts, P., Gu, Z., Spitz, L., Tabb, M.M., Nomura, M., Goldfarb, D.S., 1996. In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J. Cell Biol.* 135, 329–339.
- Song, J.Y., Lim, J.W., Kim, H., Morio, T., Kim, K.H., 2003. Oxidative stress induces nuclear loss of DNA repair proteins Ku70 and Ku80 and apoptosis in pancreatic acinar AR42J cells. *J. Biol. Chem.* 278, 36676–36687.
- Stinnett, S.M., Espeso, E.A., Cobeno, L., Araujo-Bazan, L., Calvo, A.M., 2007. *Aspergillus nidulans* VeA subcellular localization is dependent on the importin alpha carrier and on light. *Mol. Microbiol.* 63, 242–255.
- Suelmann, R., Sievers, N., Fischer, R., 1997. Nuclear traffic in fungal hyphae: in vivo study of nuclear migration and positioning in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 25, 757–769.
- Takenaka, I.M., Leung, S.M., McAndrew, S.J., Brown, J.P., Hightower, L.E., 1995. Hsc70-binding peptides selected from a phage display peptide library that resemble organellar targeting sequences. *J. Biol. Chem.* 270, 19839–19844.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A., Davies, R.W., 1983. Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* 26, 205–221.
- Tran, E.J., Went, S.R., 2006. Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125, 1041–1053.
- Weis, K., Ryder, U., Lamond, A.I., 1996. The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *EMBO J.* 15, 1818–1825.
- Wu, L., Osmani, S.A., Mirabito, P.M., 1998. A role for NIMA in the nuclear localization of cyclin B in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* 141, 1575–1587.
- Xiang, X., Zuo, W., Efimov, V.P., Morris, N.R., 1999. Isolation of a new set of *Aspergillus nidulans* mutants defective in nuclear migration. *Curr. Genet.* 35, 626–630.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P.C., Dou, X., Perez-Balaguer, A., Osmani, S.A., 2004. Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 3, 1359–1362.
- Zhao, R., Davey, M., Hsu, Y.C., Kaplanek, P., Tong, A., Parsons, A.B., Krogan, N., Cagney, G., Mai, D., Greenblatt, J., Boone, C., Emili, A., Houry, W.A., 2005. Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell* 120, 715–727.

Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*

Lidia Araujo-Bazán, Miguel A. Peñalva* and Eduardo A. Espeso

Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas CSIC, Ramiro de Maeztu, 9, Madrid 28040, Spain.

Summary

AbpA, SlaB and AmpA, three demonstrated components of the endocytic internalization machinery, are strongly polarized in *Aspergillus nidulans* hyphae, forming a ring that embraces the hyphal tip, leaving an area of exclusion at the apex. AbpA, a prototypic endocytic internalization marker, localizes to highly motile and transient (average half life, 24 ± 5 s) peripheral punctate structures overlapping with actin patches, which also predominate in the tip. SlaB also localizes to peripheral patches, but these are markedly more abundant and cortical than those of AbpA. In contrast to its polarized distribution in hyphae, endocytic patches show random distribution during the isotropic growth phase preceding polarity establishment, but polarize as soon as a germtube primordium emerges from the swelled conidiospore. Thus, while endocytosis can occur along the hyphae, the apical predominance and the spatial organization of actin patches and of the above endocytic machinery proteins as a slightly subapical ring strongly suggests that tight spatial coupling of apical secretion and subapical compensatory endocytosis underlies hyphal growth. In agreement, the phenotype of a null *slaB* allele indicates that endocytosis is essential.

Introduction

Actin plays a key role in endocytosis, a process by which eukaryotic cells internalize portions of plasma membrane and associated proteins. In the ascomycete yeast *Saccharomyces cerevisiae*, endocytosis takes place in an actin-dependent mode at two different cortical structures

differing in motility and protein composition. Actin patches are relatively well understood, motile structures with changing protein composition where clathrin-dependent endocytosis takes place through an ordered pathway in which different protein modules play sequential roles during membrane internalization and vesicle scission (Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Huckaba *et al.*, 2004; Kaksonen *et al.*, 2005; Newpher *et al.*, 2005; Newpher and Lemmon, 2006; Sun *et al.*, 2006). Less understood eisosomes are static structures primarily composed of two proteins, Pil1 and Lsp1 (Walther *et al.*, 2006). While these two pathways most likely share common protein components, the eisosomal pathway appears to predominate in mother cells whereas actin patches predominate in buds (Walther *et al.*, 2006).

In the model yeasts *S. cerevisiae* (Pruyne and Bretscher, 2000a,b) and *Schizosaccharomyces pombe* (Marks *et al.*, 1986), polarized growth correlates with actin patch polarization and in budding yeast it has been shown that actin patches are assembled at sites of polarized growth (Smith *et al.*, 2001). Thus, polarization of actin patches in cells of fungi as evolutionary divergent as fission and budding yeasts actually suggests that these structures play a role in polar growth (Pelham and Chang, 2001). As actin patches are sites of endocytosis, this suggests that polar growth taking place through localized deposition of membrane/cell wall material not only involves a dedicated secretory pathway but also active endocytosis taking place at or very close to sites of secretory vesicle delivery, the pole(s).

Hyphal cells of filamentous fungi represent an extreme example of polarized growth (Momany, 2002). After a period of isotropic expansion, the germinating fungal spore establishes a polarity axis, which leads to the emergence of a germtube that grows by apical extension, resulting in the characteristic tubular morphology of the hyphal cell. Polarized secretion underlies hyphal growth and reflects the polarization of the microtubule cytoskeleton, which is used for long-range movement of secretory vesicles towards the apex (Lehmle *et al.*, 1997; Seiler *et al.*, 1997; Horio and Oakley, 2005) but additionally involves the Spitzenkörper, a specialized organelle idiosyncratic to filamentous fungi which is thought to act as a

Accepted 18 December, 2007. *For correspondence. E-mail penalva@cib.csic.es; Tel. 3491 8373112; Fax 3491 5360432.

vesicle supply centre (Bartnicki-García *et al.*, 1989). In the current models, the Spitzenkörper is structure where vesicle transport switches from microtubule- to actin microfilament-mediated transport for the short-range vesicle delivery to the apical plasma membrane (Harris *et al.*, 2005).

According to current views, hyphal extension involves the continuous delivery of secretory vesicles to the apex (Bartnicki-García *et al.*, 1989; Harris *et al.*, 2005; Harris, 2006; Riquelme *et al.*, 2007; Steinberg, 2007a,b). The continuous addition of lipids and proteins at a localized region (the apex) implies that, to maintain the high rates of polar extension characterizing filamentous fungi, there must be a mechanism(s) ensuring that excess membrane and vesicle fusion machinery proteins are efficiently redistributed. The report that the Spitzenkörper of a number of fungi can be labelled with the endocytic membrane tracer FM4-64 (Fischer-Parton *et al.*, 2000) suggested that, as demonstrated for *S. cerevisiae* polarized growth (Valdez-Taubas and Pelham, 2003), continuous membrane recycling through an endosomal compartment might be intimately associated with polarized hyphal extension. Steinberg's group, working with the basidiomycete *Ustilago maydis*, reported the existence of a prominent endosomal compartment at the hyphal tips (Wedlich-Soldner *et al.*, 2002; Lenz *et al.*, 2006). The proximity of this compartment to the apices and studies with the endocytic cargo Pra1 led to a model in which endocytosis would predominate in the apical regions of hyphae, where this compartment would play a role in hyphal growth by mediating apical membrane/protein recycling (Steinberg, 2007a,b). If endocytosis predominates in apical regions, it follows that the endocytic internalization machinery must be polarized.

As in *S. cerevisiae*, the actin cytoskeleton in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* involves actin cables and cortical actin patches. Actin patches are highly polarized with strong predominance in apical regions (Harris *et al.*, 1994). Thus, we set out to demonstrate that the polarized distribution of actin patches in *A. nidulans* underlies polarization of the endocytic machinery at the hyphal tip, in agreement with Steinberg's model.

We used as markers three well-characterized endocytic actin patch components, denoted Abp1p, Rvs167p and Sla2p in *S. cerevisiae*. These three proteins play different molecular roles during the lifecycle of the endocytic actin patch. Abp1, a likely negative regulator of Arp2/Arp3-dependent actin nucleation (D'Agostino and Goode, 2005; Sun *et al.*, 2006), binds to sides of actin filaments (Drubin *et al.*, 1988; Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Quintero-Monzón *et al.*, 2005). We chose Abp1 as the prototypic marker of endocytic sites, as it does not associate with actin cables and localizes exclusively to actin patches (Drubin *et al.*, 1988; Huckaba *et al.*, 2004).

The actin dynamics regulator Sla2 (Wesp *et al.*, 1997) is an 'early' patch component which arrives at the endocytic patch preceding a burst of Abp1p (Kaksonen *et al.*, 2003; 2005; Newpher *et al.*, 2005). Sla2p regulates the productive association of endocytic internalization with actin polymerization and seemingly restrains actin polymerization forces during endocytic internalization (Kaksonen *et al.*, 2003; Newpher and Lemmon, 2006). Rvs167, one fungal homologue of mammalian amphiphysin (Balguerie *et al.*, 1999), is recruited to patches after and more transiently than Abp1p. Rvs167p can induce membrane curvature through its N-terminal BAR domain (Peter *et al.*, 2004) and most likely plays a role during endocytic vesicle scission (Kaksonen *et al.*, 2005).

Here we show that fluorescent fusion protein-tagged versions of AbpA, SlaB and AmpA, the *A. nidulans* orthologues of Abp1p, Sla2p and Rvs167p, predominate in the hyphal tip, apparently forming an 'endocytic ring' that embraces the hyphal tube slightly upstream of the apical dome where secretory vesicle delivery is thought to predominate. Deletion of the key endocytic gene *slaB* is lethal. Our data strongly support Steinberg's model (Steinberg, 2007b) and suggest that spatial association of exocytosis with endocytosis at the fungal tip underlies hyphal growth.

Results

Characterization of abpA, the A. nidulans gene encoding actin binding protein 1

Abp1p is a prototypical marker of endocytic patches. The *A. nidulans* orthologue of *S. cerevisiae* Abp1p is the product of AN8873.3 (BLAST expect value = 1×10^{-36}). We determined the structure of this chromosome VII right arm gene, that we denoted *abpA*, by cDNA sequencing (Fig. 1A). The 774 residue AbpA protein shows 24% overall identity to yeast Abp1p, a demonstrated multiple adaptor (Lila and Drubin, 1997; Fazi *et al.*, 2002; Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Quintero-Monzón *et al.*, 2005). The domain organization of AbpA (Fig. 1A), unambiguously identifies it as the Abp1p orthologue. Like Abp1p, AbpA contains the characteristic N-terminal actin depolymerizing factor homology (ADFH) domain (residues 20–154) that binds actin filaments (Quintero-Monzón *et al.*, 2005) and has a C-terminal SH3 domain (residues 718–771) but, in contrast to Abp1p and all other yeast orthologues, it contains a second SH3 domain (residues 627–684) whose presence, according to multiple sequence alignments, characterizes filamentous fungal proteins (data not shown). AbpA contains several PXXP motifs (Fig. 1A), potentially representing binding sites for the SH3-containing, interacting partners of the endocytic internalization machinery. In Abp1, these motifs are bound

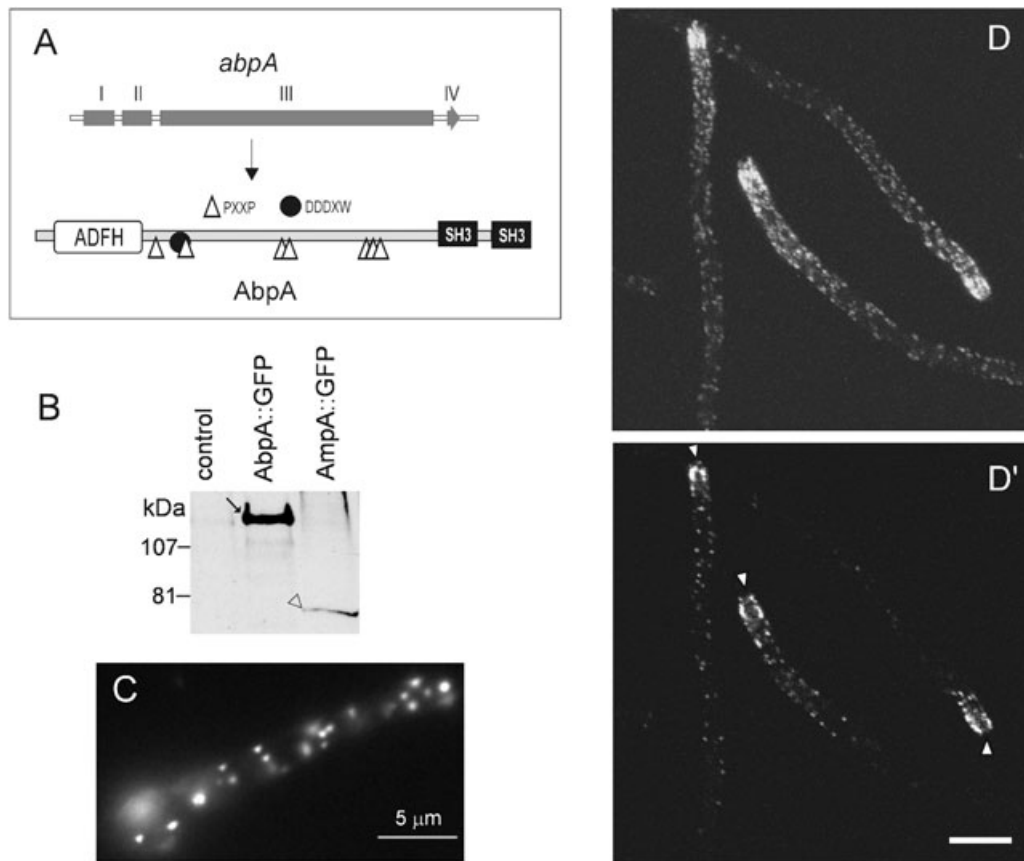


Fig. 1. AbpA localizes to peripheral punctate structures that are polarized and predominate in a slightly subapical ring.
 A. Exon/intron structure of the *abpA* gene and domain organization of AbpA. The four exons are indicated with roman numbers; see text for details.
 B. Western blot analysis of protein extracts from strains expressing AbpA-GFP, AmpA-GFP (see below) or no GFP fusion protein. The blot was reacted with anti-GFP antibodies. The black arrow indicates the AbpA-GFP fusion protein whereas the white arrowhead indicates AmpA-GFP.
 C. Subcellular localization of AbpA-GFP.
 D. Maximal projection of a z-stack of confocal optical sections showing the peripheral subcellular localization of AbpA-GFP patches and their polarized distribution. Note that hyphal tips are not capped by AbpA-GFP patches.
 D'. A middle-plane section corresponding to the z-stack in (D). Note that AbpA-GFP predominates in a slightly subapical region, where patches form a ring embracing the hyphal tips slightly behind the apices (arrowheads). (D) and (D') correspond to Supplementary movie 1. The bar represents 5 μ m.

by Rvs167p (Colwill *et al.*, 1999) and Sla1p (Warren *et al.*, 2002). Finally, of the two acidic, Trp-containing motifs mediating Arp2/3 activation by Abp1p (Goode *et al.*, 2001), only the most N-terminal is conserved in AbpA (Fig. 1A and Fig. S1). A previously unnoticed feature revealed by multiple sequence alignments including ascomycete (both yeast and filamentous fungi) orthologues is that this Trp-containing motif is invariably associated with a fully conserved, Tyr- and Pro-containing 12-residue motif located immediately downstream, which in filamentous fungi is tandemly repeated three times (Fig. S1).

An *A. nidulans* mutant carrying a precise deletion of the AbpA coding region was constructed by gene replacement. As with the corresponding gene deletion in yeast, *abpA* Δ showed no evident growth phenotype (we

tested the *A. nidulans* mutant at 25°C, 37°C and 42°C) and was not deficient in bulk membrane internalization as determined using FM4-64 (Peñalva, 2005). These results suggest that AbpA plays a functionally redundant role. In *S. cerevisiae* Abp1p functionally overlaps with Sla1p, Sla2p and Sac6p (Adams *et al.*, 1993; Holtzman *et al.*, 1993).

GFP- or mRFP-tagged AbpA localizes to cortical patches

We expressed AbpA-GFP and AbpA-mRFP at physiological levels after gene replacement (Yang *et al.*, 2004). Strains in which resident *abpA* had been substituted by either the *abpA*-GFP or the *abpA*-mRFP transgene grew

similarly to the wild type at 25°C, 37°C and 42°C on synthetic or complete media and expressed fusion proteins of the expected size, as indicated by Western blot analyses using anti-GFP (Fig. 1B) and anti-mRFP (data not shown) antibodies.

As determined by wide-field (Fig. 1C) and confocal microscopy (Fig. 1D and D'; Supplementary movie 1 shows a 3D reconstruction of a confocal z-stack), AbpA localizes to peripheral punctate structures, markedly similar to yeast Abp1p/actin patches. The punctate pattern of AbpA-mRFP was indistinguishable from that of AbpA-GFP (data not shown; see also below). Importantly, AbpA patches are polarized (Fig. 1D and D'), although their relative abundance at the tip seems to increase with the length of the germ tube, resulting in less prominent polarization in short germlings compared with long ones. Thus we detected AbpA polarization in 71% of the germlings shorter than 10 µm, although this figure increased to 89% when germlings longer than 10 µm were considered ($n = 100$). Polarization was most prominent in hyphae. The most notable aspect of AbpA predominance at the hyphal tip is that AbpA patches seem to be excluded from

the apex (the extreme tip of the filamentous cell), where the Spitzenkörper lies (Fig. 1D and D' and Supplementary movie 1). This observation will be further considered below.

In long germlings, the average number of patches in regions located upstream of the tip is ~0.8 per micrometre, a figure which is similar to that determined for subapical compartments (data not shown). The presence of AbpA patches not only in apical but also in subapical compartments strongly indicates that endocytosis is also active in the latter, strongly supporting the conclusions of previous studies in *Neurospora crassa* (Fischer-Parton *et al.*, 2000) and *A. nidulans* (Peñalva, 2005) using FM4-64.

Like yeast Abp1p patches, AbpA patches are highly motile (Supplementary movie 2) and undergo a phase of short range movement within a given focal plane before they move inwardly towards the cytosol, leaving the focal plane and seemingly disassembling. In some rare examples AbpA patches move over longer distances in a single plane (not shown). As most patches remain in the same focal plane for most of their lifetime, we used 3D time lapse microscopy for their analysis. Figure 2 shows

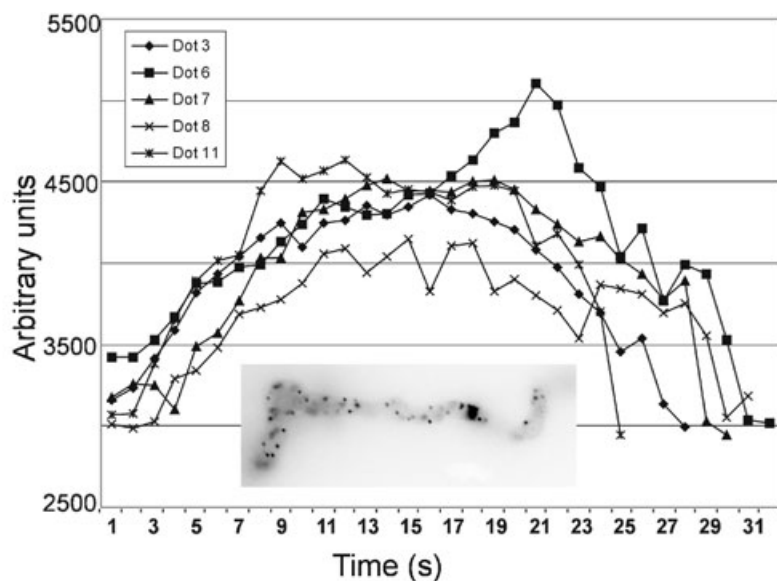
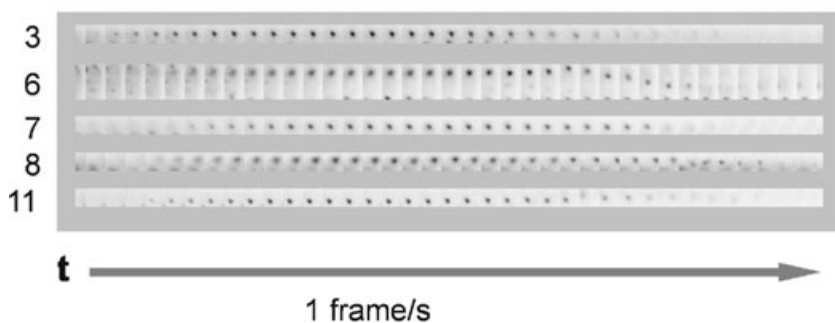


Fig. 2. Lifetime of *A. nidulans* AbpA patches. Quantification of AbpA-GFP fluorescent intensity in five representative patches over time is shown in arbitrary units. Each curve represents data from one patch. Frames shown below display the fluorescence of the corresponding patches over time. Patches were taken from Supplementary movie 2, corresponding to the germling shown in the inset.



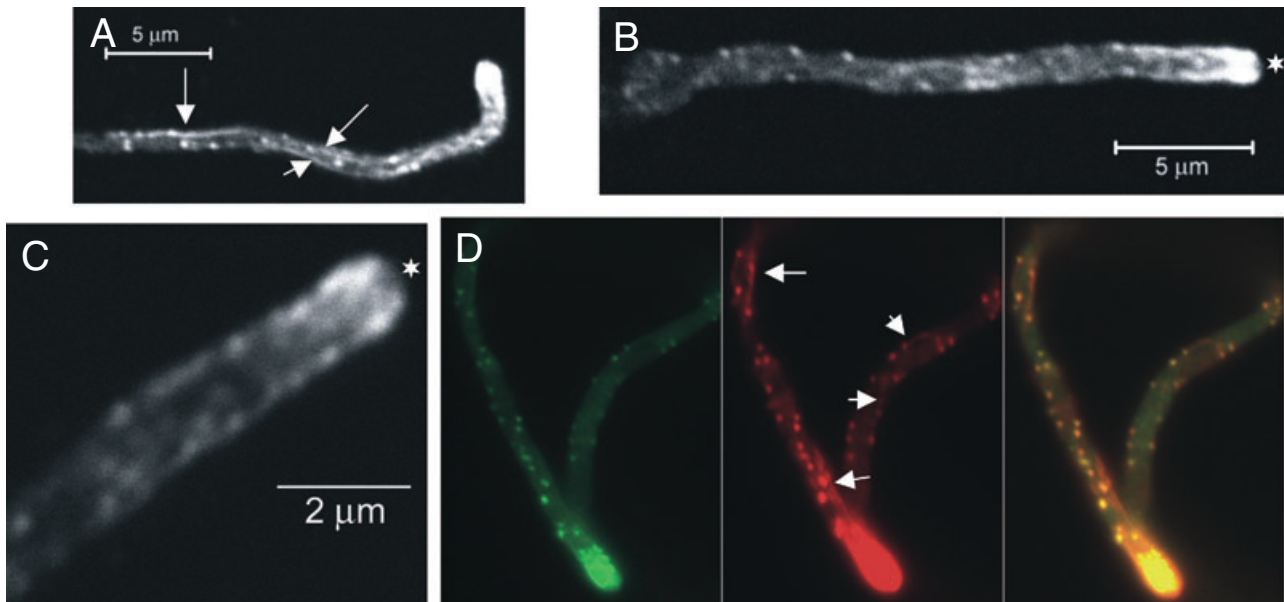


Fig. 3. AbpA colocalizes with actin patches but not with actin cables.

A. The *A. nidulans* actin cytoskeleton, as revealed by immunofluorescence microscopy. Confocal optical section showing actin cables (indicated with arrows) and peripheral actin patches, which coalesce in the tip as the images were digitally contrasted to improve visualization of patches in regions distal from the tip as well as actin cables.

B. This confocal image was contrasted to emphasize the apical region which does not stain with anti-actin antibody (indicated with an asterisk). Patches in tip-distant regions and cables are also noticeable.

C. Confocal optical section showing the subapical actin ring and the region of exclusion at the tip.

D. AbpA-GFP (left panel) labels peripheral actin patches but not actin cables (middle panel, both revealed by immunofluorescence; cables indicated with arrows). Right panel, merged red and green channels.

representative examples of AbpA patches during their complete lifetime, which was determined to be, on average, 24 ± 5 s (three different germlings, $n = 20$). While this figure which is somewhat larger than the lifetime of yeast Abp1p patches (about 15 s, Kaksonen *et al.*, 2003), we note that our experiments were carried out at 23°C rather than 25°C.

AbpA patches colocalize with actin patches

We used indirect immunofluorescence (with anti-actin monoclonal antibody, see *Experimental procedures*) to visualize the actin cytoskeleton. As previously reported (Harris *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 2001), we found that actin predominates at the hyphal tip and further localizes, in addition to septa (not shown), to cortical actin patches and actin filaments ('cables' Fig. 3A–C). Using confocal microscopy, we observed that these actin cables appear to connect cortical actin patches (Fig. 3A–C). As with AbpA, we observed, in middle planes, that the actin cap at the tip is often seen as a subapical ring which embraces the hyphal tube slightly upstream of the apex (Fig. 3B and C). Such a ring was also visible in the wide-field images previously published by others (Harris *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 2001) and in confocal images of MesA, a recently described TMD protein involved in stabilizing polarity axes

in *A. nidulans* (Pearson *et al.*, 2004). Work submitted elsewhere (N. Taheri-Talesh *et al.*, submitted) demonstrates, using GFP-actin, the existence of this subapical actin ring in living hyphae.

Using wide-field microscopy, we imaged actin in combination with AbpA-GFP in fixed cells. Apical AbpA-GFP colocalizes with the prominent apical actin signal. In subapical patches, where the actin signal does not coalesce into a broad spot, colocalization of actin and AbpA is nearly complete (Fig. 3D). Importantly, AbpA-GFP does not label actin cables (Fig. 3D, arrowed).

AbpA localization is F-actin dependent and unaffected by MT depolymerizing drugs

Abp1p binds to actin filaments through the ADFH domain, and this binding is required for Abp1p localization to cortical patches *in vivo* (Quintero-Monzón *et al.*, 2005). AbpA relocates from cortical patches to the cytosol when germlings were incubated with the F-actin interfering drug latrunculin B (Fig. 4A and B). In contrast, its normal localization was not detectably affected in cells treated for 10–20 min with the microtubule depolymerizing agent benomyl (Fig. 4C). Notably, energy depleting treatment of cells with a poisonous mixture of sodium azide and fluoro-ride led to depolarization and clustering of AbpA patches

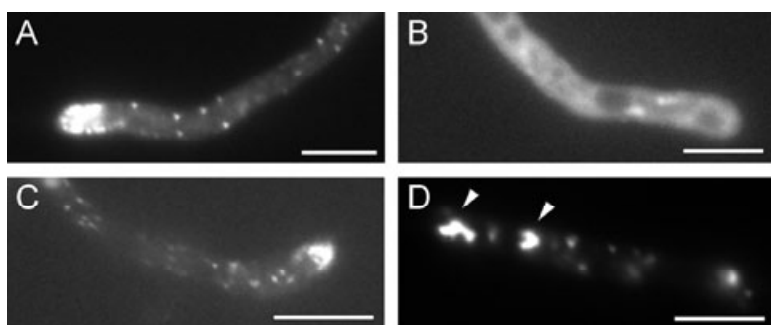


Fig. 4. AbpA localization to endocytic patches is F-actin dependent. Germlings of a strain expressing AbpA-mRFP were incubated for 10–15 min in the presence of the following compounds:
A. No addition.
B. latrunculin B, 100 μ M.
C. Benomyl, 3 μ g ml⁻¹.
D. 10 mM sodium azide plus 10 mM NaF. Arrowheads indicate prominent clusters of actin patches resulting from this metabolic poisoning treatment. The bars represent 5 μ m.

into bright cortical structures (Fig. 4D). Therefore, AbpA polarization reflects its binding to F-actin patches predominating in the apical actin cap. In view that Abp1 is a prototypic marker of endocytosis (Kaksonen *et al.*, 2003; 2005; Huckaba *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006), these and the above results strongly suggest that the marked polarization of cortical actin in *A. nidulans* reflects predominance of endocytic sites in the tip.

AbpA patches are randomly distributed during isotropic growth and polarize after germ tube emergence

In view of the marked polarization of the endocytic machinery in germlings and hyphae, we followed the distribution of AbpA-mRFP through hyphal morphogenesis, starting from conidiospores (see Momany, 2002 for a review). After breaking dormancy, conidiospores undergo a phase of isotropic growth ('swelling'), which was the only phase at which AbpA showed random localization (Fig. 5A). Shortly after the polarity axis is established, as indicated by the presence of a discernable germtube primordium, predominance at the tip of this germtube was noticeable (Fig. 5B). Polarization was clearly seen in progressively longer germlings and in hyphae (Fig. 5C–F), although, as noted above, it is more prominent in the latter. In addition, we occasionally observed clustering of AbpA patches near the septa, at their apical side. AbpA-mRFP also labelled tips of germtube primordia during early stages of branch emergence (Fig. 5G) or the tips of secondary germ tubes which emerge opposite to the primary germ tube from the same conidiospore (Fig. 5H). Thus, polarized growth correlates with polarized endocytosis.

*AmpA, the *A. nidulans* homologue of yeast amphiphysin-like Rvs167p also shows a polarized distribution*

Saccharomyces cerevisiae has two amphiphysin-like proteins containing an N-BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) domain, Rvs161p and Rvs167p. These proteins act in a complex that is thought to play a key role in membrane

scission during endocytic vesicle internalization, at least in part mediated by the ability of the BAR domain to bind highly curved lipid membranes and to tubulate membranes *in vitro* (Peter *et al.*, 2004). Indeed, Kaksonen *et al.* demonstrated that in null *rvs167* mutants, a proportion (~25%) of endocytic sites appear to show a failure in scission. Importantly, Rvs167p localization to cortical patches is F-actin independent (Kaksonen *et al.*, 2005) and thus Rvs167p is a *bona fide* marker of endocytosis.

Aspergillus nidulans has single Rvs167p and Rvs161p orthologues, corresponding to AmpA (AN2516) and AmpB (AN8831) (Sánchez-Ferrero and Peñalva, 2006). We obtained (from Dr Steve Osmani) a strain expressing AmpA-GFP, constructed by gene replacement, such that the fusion protein was the only source of AmpA. Growth of this strain was slightly impaired compared with those expressing AbpA-GFP or AbpA-RFP. AmpA appears to be markedly less abundant than AbpA, as determined by Western blot analysis of strains expressing GFP-tagged versions of these proteins (Fig. 1B).

In *S. cerevisiae*, Rvs167p overlaps with Abp1p at endocytic patches. AmpA-GFP localized to peripheral patches and to the cytosol (Fig. 6A) and colocalizes with AbpA-mRFP (Fig. 6B). However, AmpA-GFP patches are less numerous than those of AbpA-mRFP, possibly because AmpA might stay in the endocytic patch for a shorter period of time, as reported for *S. cerevisiae* Rvs167p, whose localization to endocytic patches is more transient than that Abp1p (Kaksonen *et al.*, 2005). Most importantly, AmpA-GFP patches show marked predominance at the tips (Fig. 6A).

The key endocytic patch component Sla2 localizes to a slightly subapical ring at the hyphal tips

Sla2 and its orthologues are transient components of endocytic sites that, from fungi to mammals, play a role in endocytic internalization by facilitating the functional interaction between actin and the endocytic machinery (Engqvist-Goldstein *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae*, Sla2p couples actin polymerization to early endocytic events involving Arp2/3 activators, clathrin and endocytic

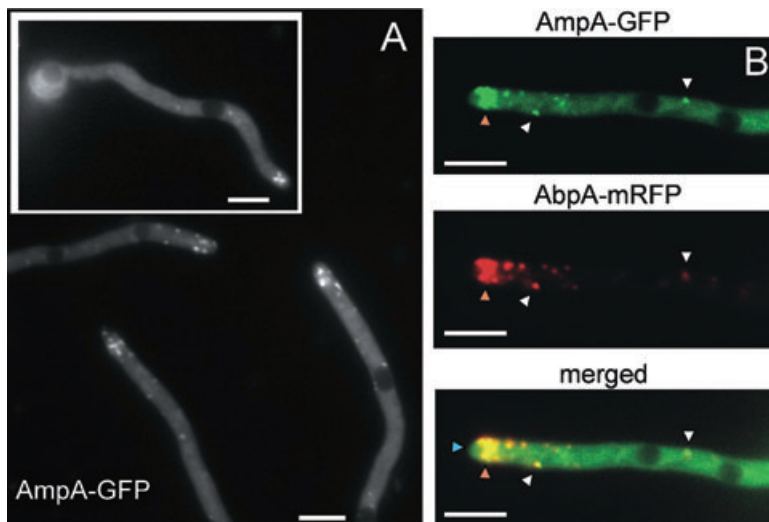


Fig. 6. AmpA predominates in the tips and colocalizes with AbpA. A. Localization of AmpA–GFP. Also note conspicuous cytosolic fluorescence. B. Colocalization of AmpA–GFP and AbpA–mRFP. White arrowheads point at two patches where AbpA–mRFP and AmpA–GFP colocalize. The orange arrowhead points to the subapical ring where endocytic patches coalesce into a broader signal. The blue arrowhead points at the region of exclusion at the hyphal tip. The bars represent 5 μ m.

planes, SlaB–GFP patches appeared to be intimately associated with the plasma membrane (Fig. 7C and D), in agreement with the predicted phosphoinositide specificity of its ANTH domain. Most importantly, these patches show a marked predominance at the hyphal tip (Fig. 7C and D), strongly supporting our contention that endocytosis predominates in this region.

Imaging of tip regions where SlaB–GFP predominates led to two additional, important observations. First, as noted above for AbpA and actin, SlaB patches coalesce in the tip but they are excluded from the apical region, leaving a narrow zone devoid of fluorescence (Fig. 7C insets and Fig. 7D). Imaging this region of exclusion was greatly facilitated by the cortical localization of SlaB–GFP. Figure 7C shows that the reporter actually forms a truncated cone-shaped ring at the apexes that, we propose, reflects the shape of the endocytic ring at the tip. Second, double imaging experiments with AbpA–mRFP showed that, in middle planes, AbpA–mRFP does not colocalize with SlaB–GFP as the AbpA signal clearly lies inside the cortical SlaB ring (Fig. 7E).

In summary, three demonstrated endocytic markers form a ring at the tip, leaving a region of exclusion at the apex. This region of exclusion corresponds to the site at which secretion markedly predominates (N. Taheri-Talesh *et al.*, submitted).

In the absence of the essential gene slaB, conidiospores appear to establish an abortive polarity axis

Our data strongly indicated that endocytic internalization plays a role in polarized hyphal extension. If this were true, key endocytic internalization genes should be essential, at least for vegetative growth. We demonstrated that *slaB* is essential. Using reported procedures

(Osmani *et al.*, 2006a) (see *Experimental procedures*), we assembled by fusion PCR a deletion construct in which the complete *slaB* coding region had been substituted by *A. fumigatus pyrG*. This fragment was used to transform protoplasts from a *pyrG89 nkuAΔ* recipient strain (Nayak *et al.*, 2005). Mycelial patches of primary transformants transferred to minus pyrimidine medium led to colonies with characteristic heterokaryotic appearance (Fig. 8A). Conidiospores collected from these heterokaryons gave rise to vigorously growing colonies on medium containing pyrimidines, but led to very poor growth on medium lacking pyrimidines (Fig. 8B), strongly indicating that *slaB* can only be maintained in heterokaryosis (*A. nidulans* conidia are mononucleate) (Osmani *et al.*, 2006b). On repeated transfer to minus pyrimidine medium, heterokaryotic colonies gave rise to fast growing, almost certainly diploid, sectors (data not shown, see also below).

We used Southern analysis to confirm the presence of both *slaB*⁺ and *slaBΔ* alleles in DNA isolated from the above heterokaryons (Fig. 8C). This analysis additionally revealed that, as described for the lethal *nimaΔ* mutation (Ye *et al.*, 1998), *slaBΔ* heterokaryons were strongly imbalanced, with strong predominance of *slaB*⁺ nuclei. This was clearly shown by markedly low abundance of the *slaBΔ* diagnostic bands relative to those corresponding to the wild-type allele in heterokaryotic transformants T#1 and T#2 (Fig. 8C), which was in stark contrast with the stoichiometric levels detected in transformant T#4, almost certainly representing a diploid. We concluded that *slaB* is essential.

Conidiospores carrying a deletion allele of an essential gene can be recovered from heterokaryons and distinguished from conidia carrying untransformed nuclei because the latter are unable to germinate without pyrimidines. We confirmed that after a 24 h incubation at 25°C in minus pyrimidine medium, no untransformed

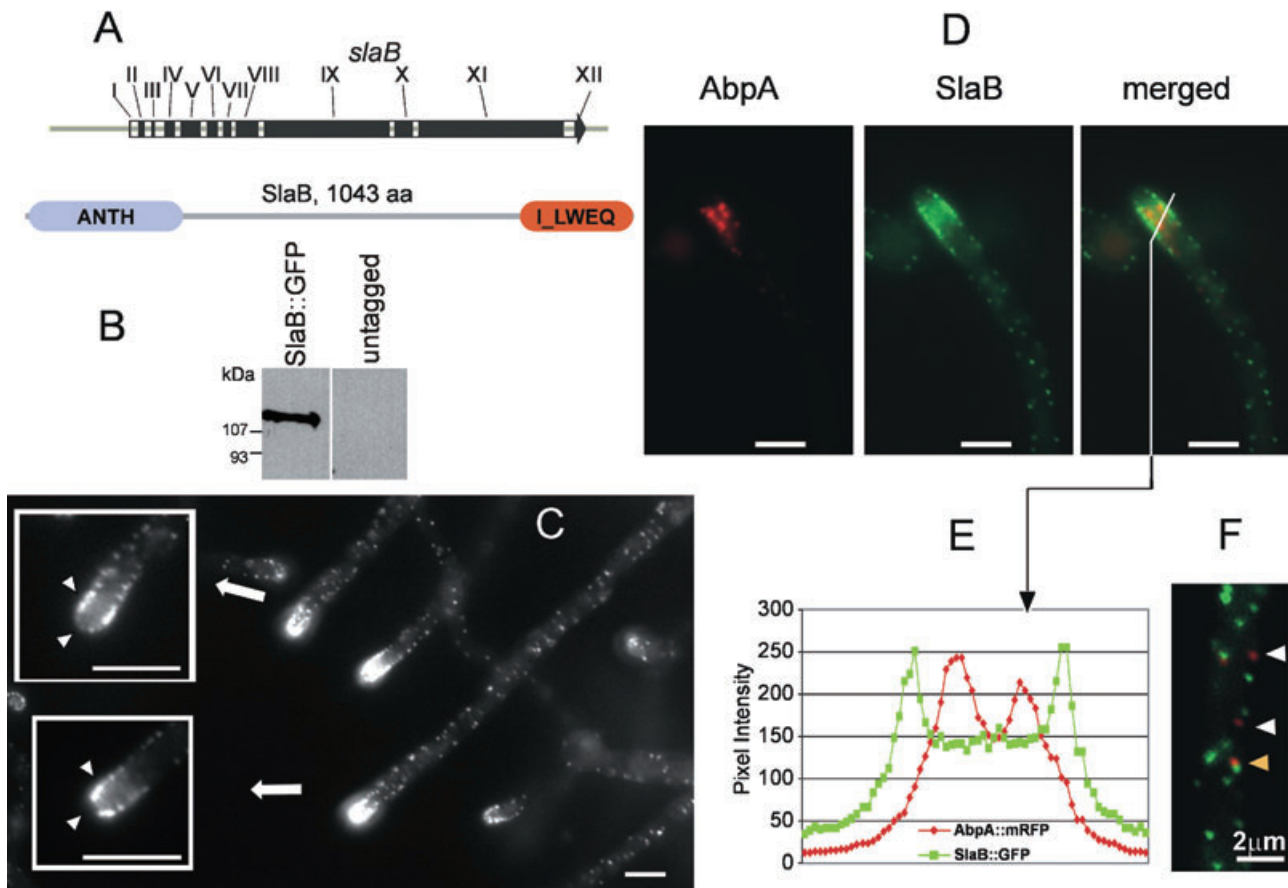


Fig. 7. SlaB-GFP localization.

A. Intron/exon structure of *slaB* and domain structure of SlaB. Exons are indicated with roman numbers and shown in dark gray. I_LWEQ is the talin homology domain.

B. Western blot analysis of protein extracts from strains expressing GFP-tagged or untagged versions of SlaB, as indicated. The blot was reacted with anti-GFP antibodies.

C. SlaB-GFP shows cortical localization and strong predominance in the tip. The insets clearly show how the reporter is excluded from the apex and concentrates in a subapical ring.

D. Double labelling experiments with a strain expressing AbpA-mRFP and SlaB-GFP; a tip region is shown.

E. Pixel profile in the red and green channels along the line depicted in the merged image in (D).

F. As in (D), showing a region behind the tip. White arrows point at two AbpA-mRFP patches which do not overlap with SlaB-GFP, whereas the yellow arrow points at one example where AbpA-mRFP and SlaB-GFP are closely associated.

For panels C and D, the bars represent 5 μ m.

strain conidia gave rise to a detectable germtube ($n = 1514$) (Fig. 8D, 'control' inset). In contrast, we detected a discrete class accounting for 3% of conidia ($n = 1616$) collected from heterokaryons that had led to the emergence of a short, abnormally wide germtube that did not progress any further (Fig. 8D). These conidia were additionally characterized by the presence of marked indentations on their cell walls that were very conspicuous in Nomarski images (Fig. 8D). The presence of this minor phenotypic class was confirmed after a 24 h incubation in the presence of pyrimidines, where the major class of conidia corresponding to untransformed nuclei germinated and gave rise to hyphae (data not shown). Null alleles of essential genes are not efficiently propagated through asexual structures (Osmani *et al.*, 2006b). Thus,

in all likelihood, this minor, abnormal class represents the *slaBΔ* class, which strongly suggests that in the absence of the key endocytic internalization protein SlaB, conidia are able to undergo the morphogenetic switch but they give rise to a short, abnormal germtube that cannot undergo further extension.

Discussion

Apical extension characterizing polarized hyphal growth is remarkably fast. For example, apical extension takes place at $\sim 0.5 \mu\text{m s}^{-1}$ in rapidly growing hyphae of *A. nidulans* (Horio and Oakley, 2005). It is widely accepted that apical extension is highly demanding in terms of delivery of biosynthetic materials to the tip, which

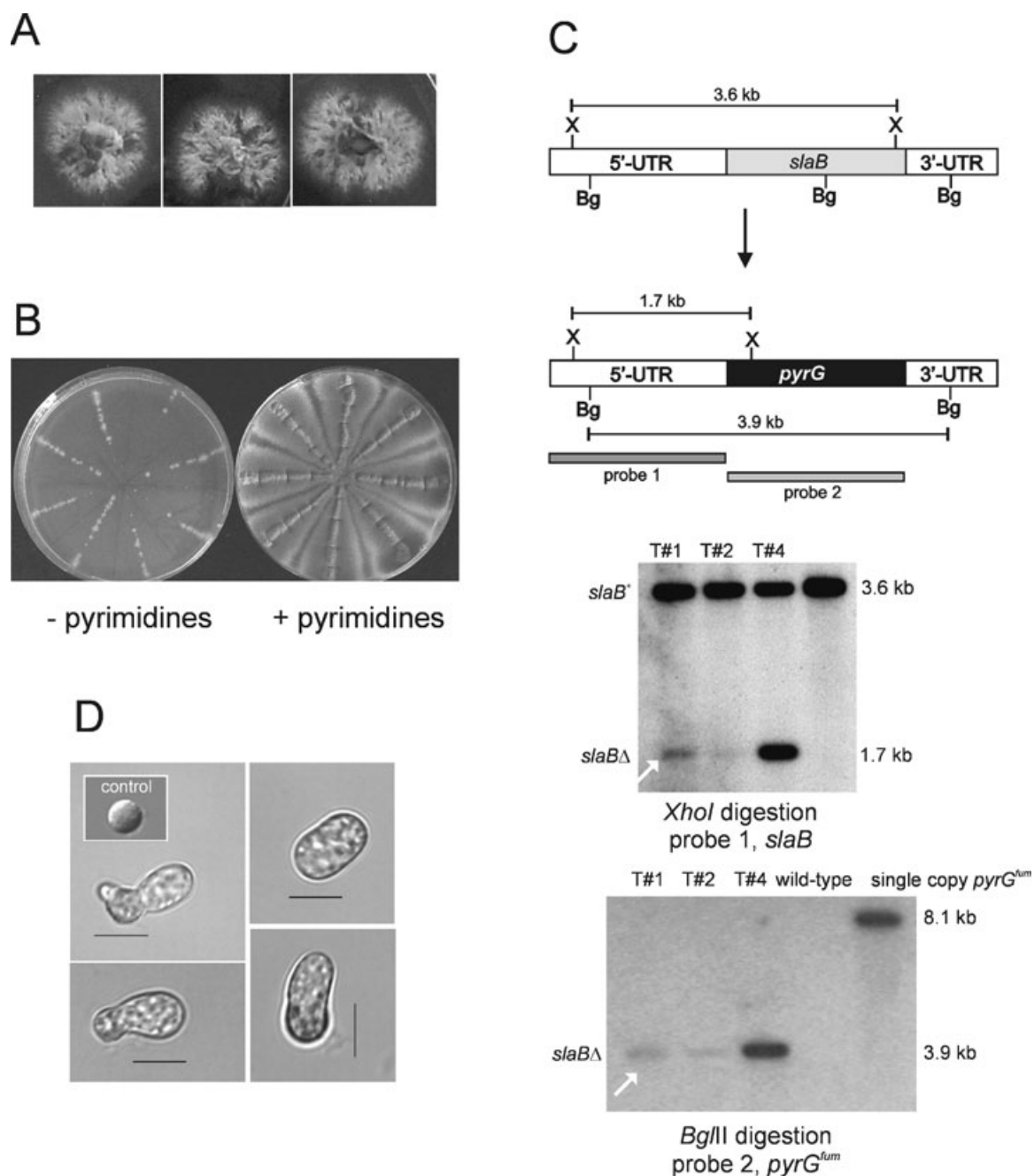


Fig. 8. Deletion analysis of *slaB*.

A. Heterokaryotic growth of *slaB* Δ transformants cultured on minus pyrimidine medium.

B. Conidia from heterokaryotic colonies were streaked on medium containing or not pyrimidines, as indicated.

C. Southern blot analyses of DNA from heterokaryotic mycelia. The expected restriction fragment sizes and the rationale of the analysis is shown schematically. X and Bg indicate *Xho*I and *Bgl*II respectively. White arrows indicate the *slaB* Δ diagnostic bands which were revealed using probes specific for *slaB* (probe 1) and *Af-pyrG* (probe 2). These bands are markedly under-represented in DNA from colonies T#1 and T#2 but not in transformant T#4 that almost certainly formed a diploid during mycelial cultivation. The single-copy *pyrG*^{fum} control in the lower panel corresponds to a strain carrying a single-copy integration of an unrelated transgene that contains *Af-pyrG*.

D. Conidiospores isolated from *slaB* Δ heterokaryons and from the control untransformed strain (inset) were cultured for 24 h at 25°C in medium lacking pyrimidines. Four abnormal germlings are shown. All pictures, including the inset, are equally scaled. The bars represent 5 μ m.

almost certainly involves deposition at the apical region of a large number secretory vesicles per unit time (Bartnicki-García *et al.*, 1989; Hohmann-Marriott *et al.*, 2006; Steinberg, 2007a). The resulting excess of membrane and of proteins involved in vesicle fusion needs to be retrieved from the apical plasma membrane and one highly attractive possibility is that, like in specialized mammalian secretory cells, this retrieval involves compensatory endocytosis (Gundelfinger *et al.*, 2003).

Strong evidence for endocytosis playing a major role in polarized fungal growth comes from studies using *U. maydis* hyphae, which have a prominent Yup1 SNARE-containing endosomal compartment located near the tip. Under restrictive conditions, *yup1^{ts}* cells are defective in the endocytic membrane trafficking through this compartment, which leads to thicker, irregularly shaped and bulged hyphae and impaired recycling of endocytosed mating pheromone receptor Pra1 at the tips of mating filaments (Wedlich-Soldner *et al.*, 2000; Lenz *et al.*, 2006; Steinberg, 2007b). The morphological abnormalities of these mutant hyphae are consistent with a polarity maintenance defect. While endosomes can reach this compartment from upstream regions loaded on microtubule-dependent motors, the localization of this compartment at the hyphal tip and the markedly polarized distribution of the recycling endocytosis cargo Pra1 strongly suggest that this process might be particularly active at or near the tip, as it has been demonstrated that polarization of membrane proteins in *S. cerevisiae* shmoo results from rapid, spatially restricted endocytic recycling (Valdez-Taubas and Pelham, 2003). Predominance of endocytic recycling at the fungal tip is also indicated by the strong labelling of the Spitzenkörper seen with the bulk membrane internalization marker FM4-64, that would reach this organelle after passing through a recycling endosomal compartment (Fischer-Parton *et al.*, 2000). Finally, in agreement with a key role of endocytosis in polarized *A. nidulans* growth, the polarity establishment mutant *swc1* is impaired in FM4-64 internalization (Lin and Momany, 2003), and a constitutively activated *A. nidulans* type I myosin *myoA* mutant shows a marked accumulation of endocytic vesicles near the tip (Yamashita and May, 1998).

If, as the above data suggest, recycling endocytosis predominates at the hyphal tips, the endocytic internalization machinery would be expected to be markedly polarized. Our results using fluorescent versions of AbpA, AmpA and SlaB demonstrate that this is indeed the case, as *A. nidulans* endocytic patches are highly polarized in hyphae and predominate at the tip, strongly indicating that endocytosis is particularly active in these regions. In fact, polarization of the endocytic machinery is noticeable as soon as germlings undergo the morphogenetic switch from isotropic to polar growth. Hence, our data represent

strongly supportive evidence of Steinberg's model, according to which recycling endocytosis plays a major role in polarized hyphal growth (Steinberg, 2007a,b). Our finding that SlaB is an essential gene is in agreement with a major role of endocytosis in filamentous fungal growth. Notably, our data suggest that while *slaBΔ* conidia are able to establish polarity, the mutation leads to malformed germlings with arrested growth shortly after germtube emergence, which would be consistent with a defect in polarity maintenance.

Our work explains the long-standing observation that the actin cytoskeleton is highly polarized in filamentous ascomycetes (Barja *et al.*, 1991; Harris *et al.*, 1994). While we cannot rule out an additional role of polarized F-actin, we show here that actin polarization reflects, at least in part, predominance of endocytosis in the tips. We confirmed, using confocal microscopy, that polarized actin clusters at a slightly subapical region. This localization of actin has also been observed *in vivo* using an actin–GFP fusion protein (N. Taheri-Talesh *et al.*, submitted). Like actin, AbpA, AmpA and SlaB predominate in the tip, clearly forming a ring located immediately behind the apex where endocytosis seems to be most active. The area of endocytic protein marker exclusion at the apex corresponds to the region where the Spitzenkörper lies. Thus, in the extreme example of polarized growth that hyphal extension represents, the subapical region where endocytosis predominates appears to be spatially coupled with the apical dome where secretion would be most active.

In *S. cerevisiae*, the secretory vesicle v-SNARE and mammalian synaptobrevin homologue Snc1p is efficiently internalized at or near those sites of the plasma membrane where secretory vesicles are delivered. Snc1p subsequently traffics through a post-Golgi endosomal compartment before returning to the Golgi for additional cycles of secretion (Lewis *et al.*, 2000). Work submitted elsewhere (N. Taheri-Talesh *et al.*, submitted) demonstrates that SynA, the *A. nidulans* orthologue of *S. cerevisiae* Snc1p, is a cargo of the endocytic ring reported here, strongly supporting that this ring mediates endocytic recycling.

One important question is what determines the organization of the endocytic machinery as a subapical ring. One possibility is that exocytosis precludes endocytosis right at the apex and a highly speculative explanation to such segregation is that the localization of the ring of endocytic proteins described here reflects, at least in part, differences in the lipid composition of the plasma membrane between the apical dome where secretion takes place and the subapical region where endocytosis predominates. Sterol-rich domains are polarized at the growing tip of *A. nidulans* (Pearson *et al.*, 2004). While their polarization depends on the subapical TMD protein

MesA (Pearson *et al.*, 2004), we note that rapid apical endocytic recycling could help to maintain polarization of lipid/protein domains (Valdez-Taubas and Pelham, 2003) and such self-organization, we hypothesize, might underlie hyphal growth. A second, non-mutually exclusive, possibility is that septins were involved in the polarization of endocytic membrane domains and/or in their segregation from exocytic ones at the hyphal tip. Septins may act as a physical barrier preventing diffusion of membrane proteins and indeed *S. cerevisiae* septins act as landmarks to determine cortical domains, maintaining actin polarity (Barral *et al.*, 2000; Douglas *et al.*, 2005).

We note that the fungal tip resembles *Drosophila* neuromuscular junctions in that endocytic machinery is spatially arranged as a ring surrounding sites of polarized exocytosis (reviewed in Gundelfinger *et al.*, 2003). Therefore, we should like to suggest that polarized hyphal growth represents one additional example of tight coupling of exocytosis and compensatory endocytosis.

Experimental procedures

Aspergillus nidulans techniques

Aspergillus nidulans strains carried markers in standard use (Clutterbuck, 1993). MAD782 (*yA2 pabaA1 pyrG89*) was used for gene replacements of *abpA* by the *abpA::GFP* or the *abpA::mRFP* alleles. MAD1425 (*pyroA4 argB2 pyrG89 ΔnkuA::argB*) (Nayak *et al.*, 2005) was used for gene replacement of *slaB* by the *slaB::GFP* allele and for constructing the *abpA* and *slab* null alleles. Transformation was as described (Tilburn *et al.*, 1983). Benomyl (3 µg ml⁻¹), azide and sodium fluoride (10 mM each) and latrunculin B (100 µM) were used as described (Peñalva, 2005), except that the incubation of germlings with the drugs was for 10–15 min at 25°C.

Western blot analyses

Aspergillus nidulans mycelia collected on Miracloth (Calbiochem) were pressed dry, frozen in liquid nitrogen and lyophilized overnight. Protein was extracted essentially as described (Fernández-Martínez *et al.*, 2003) in a buffer containing 5 mM Hepes pH 7.5, 1 mM EDTA, 20 mM KCl, 0.1% NP-40 and 0.5 mM DTT (Drubin *et al.*, 1988) with Roche's complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (one tablet per 10 ml). Fifty micrograms of protein samples was resolved in 10% polyacrylamide gels before electrotransfer to nitrocellulose filters which were reacted with anti-GFP rabbit polyclonal antibody (1/10000) for GFP-tagged proteins, or anti-mRFP chicken polyclonal antibody (Clontech) 1/5000 for mRFP-tagged proteins. Peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit (Amersham) or antichick (Clontech) IgG immunoglobulins were used as secondary antibodies at 1/10 000.

Characterization of cDNA

The cDNA sequences and intron/exon organization of the *abpA* and *slaB* genes have been deposited in GenBank

under accession numbers EF107688 and EF107689 respectively. RNA was isolated from mycelia cultured at 37°C in appropriately supplemented Cove's minimal medium (Cove, 1966) with 5 mM ammonia and 1% (w/v) glucose as sole nitrogen and carbon source respectively. Synthesis of single-stranded cDNA, which was used as template for PCR-mediated amplification of gene-specific double-stranded cDNAs, was made with AMV reverse transcriptase, using Invitrogen's First-Strand Synthesis kit.

Construction and characterization of recombinant *A. nidulans* strains

DNA fragments containing *abpA::GFP*, *abpA::mRFP* and *slaB::GFP* transgenes were constructed using the GA-5–GFP–*Af-pyrG* and GA-5–mRFP–*Af-pyrG* cassettes (obtained from Dr S. Osmani) as described (Yang *et al.*, 2004). Primer pairs Abp1/Abp2 (for primers, see Table S1) and Abp3/Abp4 were used to amplify the *abpA* coding and 3'-flanking regions respectively. Primer pair Rfp1/Rfp2 was used to amplify the GA-5–GFP–*Af-pyrG* and GA-5–mRFP–*Af-pyrG* cassettes with attached *abpA*-specific sequences. Primer pairs Sla1/Sla2 and Sla3/Sla4 were used to amplify the *slaB* coding and 3'-flanking regions respectively. Primers Slagfp1/Slagfp2 were used to amplify the GA-5–GFP–*Af-pyrG* cassette with attached *slaB*-specific sequences.

The complete coding regions of *abpA* and *slaB* were replaced by *Af-pyrG*, which was amplified from the GA-5–GFP–*Af-pyrG* cassette using primers Abp-pyrG and Rfp2 in the case of *abpA* and SlaNuloPyrG and Slagfp2 in the case of *slaB*. Primer pairs P-abp1/P-abp2 and Abp3/Abp4 were used to amplify the 5'- and 3'-flanking regions of *abpA*, whereas primer pairs SlaProm1/SlaProm2 and Sla3/Sla4 were similarly used for *slaB* (see Table S1).

Several independent transformants showed the expected *abpA::GFP*, *abpA::mRFP*, *slaB::GFP* or *ΔabpA* gene replacements as determined by Southern blot analysis using gene-specific probes and by long-distance PCR (Expand Long Template PCR kit, Roche) using gene-specific flanking primers (Abp5/Abp6, Sla013/Sladw, AbpNulo1/cDNA, Table S1) for *abpA* fusion transgenes, *slaB::GFP* and *ΔabpA* respectively. Primers cDNA1 to cDNA8 were used to sequence the *abpA* cDNA, and primers SlaUp, SlaDW, Sla013 and Sla014 were used to sequence the *slaB* cDNA.

Characterization of *slaBΔ* heterokaryons

Mycelial patches of primary transformants were transferred to *Aspergillus* complete medium (Cove, 1966) lacking pyrimidines, where mycelial growth showed typically heterokaryotic appearance. Portions of mycelia were then transferred to the same medium and pieces of the resulting colonies were used to inoculate liquid cultures for DNA isolation and Southern analyses. The *slaB* probe was an ~1.5 kb DNA fragment amplified with primer pair SlaProm1 and SlaProm2, whereas the *Af-pyrG*-specific probe corresponded to the *A. fumigatus* DNA insert containing the coding and flanking regulatory regions of *Af-pyrG* that is present in the deletion construct.

Microscopy

Germings of strains expressing fluorescent fusion proteins were cultured on the surface of glass coverslips immersed in 2.5 ml of appropriately supplemented 'watch' minimal medium (Peñalva, 2005) containing 1% glucose (w/v) as sole carbon source. Time series images were acquired using a Dantridish (TransMIT GmbH, Giessen, Germany, kindly donated by Dr Daniel Veith, University of Karlsruhe, Germany), as described (Peñalva, 2005). Immunofluorescence detection of actin was done essentially as described (Prigozhina *et al.*, 2001), using anti-actin C4 monoclonal (ICN Biomedicals, 1/500) and Alexa 568 goat antimouse IgG (Molecular Probes, 1/1000) as primary and secondary antibodies respectively. Wide-field epifluorescence microscopy was carried out using a Nikon E-600 upright epifluorescence microscope equipped with a 100× 1.40 N. A. plan apochromat objective. Green and red fluorescence were observed using standard B-2 A and G2-A Nikon filters, respectively, and recorded with an Orca-ER camera (Hamamatsu) driven by Metamorph (Universal Image). Confocal images of AbpA::GFP were obtained using a spectral LEICA TCS-SP2-AOBS-UV with 488 nm excitation. Confocal images of immunofluorescent actin were acquired using a Zeiss LSM510 microscope equipped with a 543 nm HeNe laser line. Image treatment was made using Leica LCS Lite or Zeiss LSM confocal software.

Acknowledgements

We thank B. Nichols for his advice with the confocal microscope, H.N. Arst and M.I. Geli for critical reading of the manuscript, B. Oakley and Naimeh Taheri-Talesh for discussions, S. Osmani for plasmids and for the AmpA-GFP strain and D. Veith for his advice with the Dantridish. This work was supported by D.G.I.C.Y.T. Grants BIO2006/0556 and BFU2006-04185-BMC to M.A.P. and E.E. respectively. L.A. is a predoctoral fellow of the P.F.P.U. of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

References

- Adams, A.E., Cooper, J.A., and Drubin, D.G. (1993) Unexpected combinations of null mutations in genes encoding the actin cytoskeleton are lethal in yeast. *Mol Biol Cell* **4**: 459–468.
- Ayscough, K.R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., and Drubin, D.G. (1997) High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J Cell Biol* **137**: 399–416.
- Balguerie, A., Sivadon, P., Bonneau, M., and Aigle, M. (1999) Rvs167p, the budding yeast homolog of amphiphysin, colocalizes with actin patches. *J Cell Sci* **112**: 2529–2537.
- Barja, F., Bich-Nga, N.T., and Turian, G. (1991) Localization of actin and characterization of its isoforms in the hyphae of *Neurospora crassa*. *FEMS Microbiol Lett* **77**: 19–24.
- Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M.S., and Snyder, M. (2000) Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol Cell* **5**: 841–851.
- Bartnicki-García, S., Hergert, F., and Gierz, G. (1989) Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal tip growth. *Protoplasma* **153**: 46–57.
- Cheng, J., Park, T.S., Fischl, A.S., and Ye, X.S. (2001) Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol Cell Biol* **21**: 6198–6209.
- Clutterbuck, A.J. (1993) *Aspergillus nidulans*. In *Genetic Maps. Locus Maps of Complex Genomes*. O'Brien, S.J. (ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 3.71–3.84.
- Colwill, K., Field, D., Moore, L., Friesen, J., and Andrews, B. (1999) In vivo analysis of the domains of yeast Rvs167p suggests Rvs167p function is mediated through multiple protein interactions. *Genetics* **152**: 881–893.
- Cove, D.J. (1966) The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim Biophys Acta* **113**: 51–56.
- D'Agostino, J.L., and Goode, B.L. (2005) Dissection of Arp2/3 complex actin nucleation mechanism and distinct roles for its nucleation-promoting factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **171**: 35–47.
- Douglas, L.M., Alvarez, F.J., McCreary, C., and Konopka, J.B. (2005) Septin function in yeast model systems and pathogenic fungi. *Eukaryot Cell* **4**: 1503–1512.
- Drubin, D.G., Miller, K.G., and Botstein, D. (1988) Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J Cell Biol* **107**: 2551–2561.
- Engqvist-Goldstein, A.E., and Drubin, D.G. (2003) Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 287–332.
- Engqvist-Goldstein, A.E., Zhang, C.X., Carreno, S., Barroso, C., Heuser, J.E., and Drubin, D.G. (2004) RNAi-mediated Hip1R silencing results in stable association between the endocytic machinery and the actin assembly machinery. *Mol Biol Cell* **15**: 1666–1679.
- Fazi, B., Cope, M.J., Douangamath, A., Ferracuti, S., Schirwitz, K., Zucconi, A., *et al.* (2002) Unusual binding properties of the SH3 domain of the yeast actin-binding protein Abp1: structural and functional analysis. *J Biol Chem* **277**: 5290–5298.
- Fernández-Martínez, J., Brown, C.V., Díez, E., Tilburn, J., Arst, H.N., Jr, Peñalva, M.A., and Espeso, E.A. (2003) Overlap of nuclear localisation signal and specific DNA binding residues within the zinc finger domain of PacC. *J Mol Biol* **334**: 667–684.
- Fischer-Parton, S., Parton, R.M., Hickey, P.C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H.A., and Read, N.D. (2000) Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J Microsc* **198**: 246–259.
- Goode, B.L., Rodal, A.A., Barnes, G., and Drubin, D.G. (2001) Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *J Cell Biol* **153**: 627–634.
- Gundelfinger, E.D., Kessels, M.M., and Qualmann, B. (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 127–139.

- Harris, S.D. (2006) Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *Int Rev Cytol* **251**: 41–77.
- Harris, S.D., Morrell, J.L., and Hamer, J.E. (1994) Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* **136**: 517–532.
- Harris, S.D., Read, N.D., Roberson, R.W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M., and Momany, M. (2005) Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* **4**: 225–229.
- Hohmann-Marriott, M.F., Uchida, M., van de Meene, A.M., Garret, M., Hjelm, B.E., Kokoori, S., and Roberson, R.W. (2006) Application of electron tomography to fungal ultrastructure studies. *New Phytol* **172**: 208–220.
- Holtzman, D.A., Yang, S., and Drubin, D.G. (1993) Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, *SLA1* and *SLA2*, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **122**: 635–644.
- Horio, T., and Oakley, B.R. (2005) The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **16**: 918–926.
- Huckaba, T.M., Gay, A.C., Pantalena, L.F., Yang, H.C., and Pon, L.A. (2004) Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **167**: 519–530.
- Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D.G. (2003) A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**: 475–487.
- Kaksonen, M., Toret, C.P., and Drubin, D.G. (2005) A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* **123**: 305–320.
- Lehmler, C., Steinberg, G., Snetselaar, K.M., Schliwa, M., Kahmann, R., and Bolker, M. (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago Maydis*. *EMBO J* **16**: 3464–3473.
- Lenz, J.H., Schuchardt, I., Straube, A., and Steinberg, G. (2006) A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J* **25**: 2275–2286.
- Lewis, M.J., Nichols, B.J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H., and Pelham, H.R. (2000) Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* **11**: 23–38.
- Lila, T., and Drubin, D.G. (1997) Evidence for physical and functional interactions among two *Saccharomyces cerevisiae* SH3 domain proteins, an adenyl cyclase-associated protein and the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **8**: 367–385.
- Lin, X., and Momany, M. (2003) The *Aspergillus nidulans* *swoC1* mutant shows defects in growth and development. *Genetics* **165**: 543–554.
- Marks, J., Hagan, I.M., and Hyams, J.S. (1986) Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl* **5**: 229–241.
- Momany, M. (2002) Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr Opin Microbiol* **5**: 580–585.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C.E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S.L., et al. (2005) A versatile and efficient gene targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genet* **172**: 1557–1566.
- Newpher, T.M., and Lemmon, S.K. (2006) Clathrin is important for normal actin dynamics and progression of Sla2p-containing patches during endocytosis in yeast. *Traffic* **7**: 574–588.
- Newpher, T.M., Smith, R.P., Lemmon, V., and Lemmon, S.K. (2005) *In vivo* dynamics of clathrin and its adaptor-dependent recruitment to the actin-based endocytic machinery in yeast. *Dev Cell* **9**: 87–98.
- Osmani, A.H., Davies, J., Liu, H.L., Nile, A., and Osmani, S.A. (2006a) Systematic deletion and mitotic localization of the nuclear pore complex proteins of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **17**: 4946–4961.
- Osmani, A.H., Oakley, B.R., and Osmani, S.A. (2006b) Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nat Protoc* **1**: 2517–2526.
- Pearson, C.L., Xu, K., Sharpless, K.E., and Harris, S.D. (2004) MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **15**: 3658–3672.
- Pelham, R.J., Jr and Chang, F. (2001) Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Cell Biol* **3**: 235–244.
- Peñalva, M.A. (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-64. *Fungal Genet Biol* **42**: 963–975.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**: 495–499.
- Prigozhina, N.L., Walker, R.A., Oakley, C.E., and Oakley, B.R. (2001) γ -tubulin and the C-terminal motor domain kinesin-like protein, KLP4, function in the establishment of spindle bipolarity in *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **12**: 3161–3174.
- Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000a) Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J Cell Sci* **113**: 365–375.
- Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000b) Polarization of cell growth in yeast. II. The role of cortical actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **113**: 571–585.
- Quintero-Monzón, O., Rodal, A.A., Strokopytov, B., Almo, S.C., and Goode, B.L. (2005) Structural and functional dissection of the Abp1 ADFH actin-binding domain reveals versatile *in vivo* adapter functions. *Mol Biol Cell* **16**: 3128–3139.
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S., Gonzalez-Prieto, J.M., Sánchez-Leon, E., Verdín-Ramos, J.A., Beltrán-Aguilar, A., and Freitag, M. (2007) Spitzenkörper localization and intracellular traffic of GFP-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **6**: 1853–1864.
- Sánchez-Ferrero, J.C., and Peñalva, M.A. (2006) Endocytosis. In *The Aspergilli: Genomics, Medical Applications, Biotechnology, and Research Methods*. Goldman, G.H., Osmani, S.A. (eds) Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 177–195.
- Seiler, S., Nargang, F.E., Steinberg, G., and Schliwa, M. (1997) Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J* **16**: 3025–3034.
- Smith, M.G., Swamy, S.R., and Pon, L.A. (2001) The life

- cycle of actin patches in mating yeast. *J Cell Sci* **114**: 1505–1513.
- Steinberg, G. (2007a) Hyphal growth: a tale of motors, lipids and the Spitzenkörper. *Eukaryot Cell* **5**: 309–316.
- Steinberg, G. (2007b) On the move: endosomes in fungal growth and pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **5**: 309–316.
- Sun, Y., Martin, A.C. & Drubin, D.G. (2006) Endocytic internalization in budding yeast requires coordinated actin nucleation and myosin motor activity. *Dev Cell* **11**: 33–46.
- Tilburn, J., Scazzocchio, C., Taylor, G.G., Zabicky-Zissman, J.H., Lockington, R.A., and Davies, R.W. (1983) Transformation by integration in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **26**: 205–211.
- Valdez-Taubas, J., and Pelham, H.R. (2003) Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr Biol* **13**: 1636–1640.
- Walther, T.C., Brickner, J.H., Aguilar, P.S., Bernales, S., Pantoja, C., and Walter, P. (2006) Eosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* **439**: 998–1003.
- Warren, D.T., Andrews, P.D., Gourlay, C.W., and Ayscough, K.R. (2002) Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *J Cell Sci* **115**: 1703–1715.
- Wedlich-Soldner, R., Bolker, M., Kahmann, R., and Steinberg, G. (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago Maydis*. *EMBO J* **19**: 1974–1986.
- Wedlich-Soldner, R., Straube, A., Friedrich, M.W., and Steinberg, G. (2002) A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago Maydis*. *EMBO J* **21**: 2946–2957.
- Wesp, A., Hicke, L., Palecek, J., Lombardi, R., Aust, T., Munn, A.L., and Riezman, H. (1997) End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **8**: 2291–2306.
- Yamashita, R.A., and May, G.S. (1998) Constitutive activation of endocytosis by mutation of myoA, the myosin I gene of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **273**: 14644–14648.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C.P., *et al.* (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **3**: 1359–1362.
- Ye, X.S., Fincher, R.R., Tang, A., Osmani, A.H., and Osmani, S.A. (1998) Regulation of the anaphase-promoting complex/cyclosome by *bimA*^{APC3} and proteolysis of NIMA. *Mol Biol Cell* **9**: 3019–3030.

Supplementary material

This material is available as part of the online article from: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2007.06102.x> (This link will take you to the article abstract).

Please note: Blackwell Publishing is not responsible for the content or functionality of any supplementary materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

The Tip Growth Apparatus of *Aspergillus nidulans*

Naimeh Taheri-Talesh,* Tetsuya Horio,*[†] Lidia Araujo-Bazán,[‡] Xiaowei Dou,*[§]
Eduardo A. Espeso,[‡] Miguel A. Peñalva,[‡] Stephen A. Osmani,* and
Berl R. Oakley*

*Department of Molecular Genetics, The Ohio State University, Columbus, OH 43210; [†]Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8503, Japan; and [‡]Departamento de Microbiología Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid 28040, Spain

Submitted May 18, 2007; Revised December 11, 2007; Accepted January 16, 2008
Monitoring Editor: David Drubin

Hyphal tip growth in fungi is important because of the economic and medical importance of fungi, and because it may be a useful model for polarized growth in other organisms. We have investigated the central questions of the roles of cytoskeletal elements and of the precise sites of exocytosis and endocytosis at the growing hyphal tip by using the model fungus *Aspergillus nidulans*. Time-lapse imaging of fluorescent fusion proteins reveals a remarkably dynamic, but highly structured, tip growth apparatus. Live imaging of SYNA, a synaptobrevin homologue, and SECC, an exocyst component, reveals that vesicles accumulate in the Spitzenkörper (apical body) and fuse with the plasma membrane at the extreme apex of the hypha. SYNA is recycled from the plasma membrane by endocytosis at a collar of endocytic patches, 1–2 μm behind the apex of the hypha, that moves forward as the tip grows. Exocytosis and endocytosis are thus spatially coupled. Inhibitor studies, in combination with observations of fluorescent fusion proteins, reveal that actin functions in exocytosis and endocytosis at the tip and in holding the tip growth apparatus together. Microtubules are important for delivering vesicles to the tip area and for holding the tip growth apparatus in position.

INTRODUCTION

Polarized cell growth occurs in most eukaryotic phyla, and it includes a plethora of important phenomena, such as neuronal growth cone extension in animals and pollen tube extension in vascular plants. It is particularly important in filamentous fungi where nearly all growth occurs by hyphal tip extension (reviewed by Momany, 2002). Given that some filamentous fungi are important fermentation organisms, the growth of which is of considerable economic importance, whereas others are serious plant, animal, and human pathogens, there is considerable interest in the mechanisms of tip growth in these organisms.

A great deal of progress has been made in understanding fungal tip growth (summarized by Harris *et al.*, 2005; Steinberg, 2007a,b; Riquelme *et al.*, 2007), but key questions remain unanswered. There is general agreement that fungal tip growth involves the synthesis of cell wall components in the cell body, the incorporation of these components into vesicles, the transport of these vesicles to the cell tip, the

fusion of these vesicles with the plasma membrane in the area of the cell tip (exocytosis) to release their contents, and the cross-linking of the components after release. It is clear that both microtubules and actin microfilaments play important roles in fungal tip growth, but their exact functions are not yet defined. The exact sites of exocytosis and endocytosis also remain to be determined. The positions of the site(s) of exocytosis are particularly important because fungal walls are relatively stiff structures, and once they have formed the shape of the hypha is established. Hyphal shape is thus determined to a very significant extent by where the wall precursors are released from the cytoplasm, i.e., by the positioning of the site(s) of exocytosis. Indeed, in the most current mathematical model of hyphal morphogenesis, the positions of the sites of exocytosis are postulated to be the main determinant of hyphal morphology (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989; Bartnicki-Garcia, 1990; Gierz and Bartnicki-Garcia, 2001). The positions of these sites are, in turn, postulated to be governed by the radial movement of vesicles from a vesicle supply center near the tip. Tip growth also likely involves the recycling, by endocytosis, of exocytic vesicle membrane (Fischer-Parton *et al.*, 2000; Wedlich-Soldner *et al.*, 2000) and proteins involved in fusion with the plasma membrane such as vesicular-soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor (v-SNAREs) (Pelham, 1999; Lewis *et al.*, 2000; Read and Kalkman, 2003). Thus, the positions of the sites of endocytosis are also important.

To begin to answer some of the outstanding questions, we have focused our attention on tip growth in the genus *Aspergillus* and the model species *A. nidulans*. Tip growth in this genus is particularly important because some species (e.g., *A. niger* and *A. oryzae*) produce economically important

This article was published online ahead of print in *MBC in Press* (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E07-05-0464>) on January 23, 2008.

[§] Present address: Department of Neurology, Harvard Medical School, VA Boston Healthcare System, 1400 VFW Pkwy., Bldg. 3 RM 2C130, West Roxbury, MA 02134.

Address correspondence to: Berl R. Oakley (oakley.2@osu.edu).

Abbreviations used: ABPA, actin-binding protein A; DMSO, dimethyl sulfoxide; GFP, green fluorescent protein; mRFP, monomeric red fluorescent protein; PCR, polymerase chain reaction; SNARE, soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor.

products, whereas others (e.g., *A. fumigatus*) are serious pathogens, particularly in immune-compromised patients (reviewed by Brookman and Denning, 2000; Latge 2001). Still other species (e.g., *A. flavus*) cause contamination of foods with toxic and carcinogenic aflatoxins (reviewed by Bhatnagar *et al.*, 2002).

Information obtained with *A. nidulans* is also likely to be informative with respect to tip growth in other organisms. Although it would be naïve to assume that all tip growth occurs by a single common mechanism, it would be equally naïve to assume that no mechanisms are shared among the different phyla. *A. nidulans* has by most measures the best system for molecular genetic manipulations among organisms that exhibit tip growth (Nayak *et al.*, 2006; Szewczyk *et al.*, 2006; Osmani *et al.*, 2006) (aside from pseudohyphal growth in *Saccharomyces cerevisiae*, which, although interesting in itself, is a slow and atypical form of tip growth), and it is clearly an organism of choice for studying this phenomenon. It is also interesting to note that the situation in *A. nidulans* is remarkably similar to the situation in certain neuromuscular junctions, strongly suggesting that fungal and specialized metazoan cells deal in a similar way with the local excess of membrane and membrane fusion machinery resulting from highly focused, persistent delivery of secretory vesicles to a limited region at the plasma membrane.

We have developed fluorescent fusions of several proteins involved in tip growth, and we have observed their locations by multidimensional time-lapse microscopy in growing hyphae. We have used these fusion proteins in combination with inhibitors of microtubule assembly and filamentous actin assembly to define more precisely the roles of microtubules in tip growth. Our results reveal the existence of a remarkably dynamic but highly structured tip growth apparatus that moves with the growing tip. We are able to define multiple roles for microtubules and actin microfilaments in tip growth and to pinpoint the sites of exocytosis and endocytosis in the tip region. These findings greatly clarify the mechanisms of tip growth and they place significant constraints on permissible models of fungal morphogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Fusion Polymerase Chain Reaction (PCR) and Strain Construction

Creation of fusion PCR products for N-terminal tagging of SYNA with green fluorescent protein (GFP) and mCherry and SSOA with GFP was carried out as shown in Supplemental Figure 1. Primers are listed in Supplemental Table 1. In this table, primer synA1-1 (P1) corresponds to primer P1 in Supplemental Figure 1, and so on. Likewise ssoA1-1 (P1) corresponds to P1 in Supplemental Figure 1, except that in this case the fusion PCR construct generated was for creating an N-terminal fusion of SSOA instead of SYNA. For both *synA* and *ssoA*, primers P5 and P6 were different for GFP and mCherry, and they are appropriately labeled. Other primers were used for both GFP and mCherry fusions. PCR enzymes and conditions were as described by Szewczyk *et al.* (2006). The *A. fumigatus* *pyrG* gene (*AfpyrG*) was used as a selectable marker. With both *synA* and *ssoA*, the promoter region amplified was ~500 base pairs in length. The amplified fragments from the 5' untranslated region of each gene and from the coding sequence of each gene (Supplemental Figure 1) were ~1000 base pairs. To improve chances that the fusion proteins would be functional, a linker of five glycines and alanines (5 GA) (Yang *et al.*, 2004) was incorporated at the C terminus of the GFP and mCherry cassettes such that there was a flexible region between each fluorescent protein and the target protein to which it was fused. The fusion constructs were transformed into strain LO1497 [*fwA1*; *nicA2*; *pyrG89*; *pyroA4*; *nkuAΔ* (*nkuA::argB*)]. Correct integration of the transforming fragment was verified by diagnostic PCR and by Southern hybridizations using the method of Oakley *et al.* (1987) with appropriate radioactively labeled fusion PCR fragments as probes. The Southern hybridizations also confirmed that there were no ectopic integrations of the transforming DNA. Multiple transformants were examined by fluore-

scent microscopy. All *synA* fusions gave the same localization patterns, and all *ssoA* fusions also gave the same localization patterns as each other. A strain expressing GFP-SYNA was designated LO1535, a strain expressing mCherry-SYNA was designated LO1539, and a strain expressing GFP-SSOA was designated LO1545. A strain (LO1548) expressing GFP-SYNA and monomeric red fluorescent protein (mRFP) fused to actin-binding protein A (ABPA-mRFP) was created by crossing LO1535 to a strain expressing ABPA-mRFP (Araujo-Bazán *et al.*, 2008). To construct a strain expressing GFP-*tubA* (α -tubulin) and mCherry-SYNA, we crossed LO1539 to LO1028 (*choA1*; *sC12*, *yA2*, *GFP-tubA*). We designated the resulting strain LO1671.

SECC was tagged at its C terminus by using fusion PCR to generate an appropriate transforming fragment (Nayak *et al.*, 2006; Szewczyk *et al.*, 2006). The *A. fumigatus* *pyrA* gene (*AfpyrA*) was used as a selectable marker. Primers are listed in Supplemental Table 1. The fusion PCR product was transformed into strain LO1540 [*fwA1*; *nicA2*; *pyrG89*; *pyroA4*; *nkuAΔ* (*nkuA::argB*); *AfpyrG::mCherry-synA*]. Two transformants were chosen and verified by diagnostic PCR and Southern hybridization. They were given the designations LO2199 and LO2200. The two strains gave identical localization patterns.

In separate experiments, tropomyosin was tagged with GFP at its N terminus and its C terminus. We initially attempted to tag the tropomyosin gene *tpmA* at its normal chromosomal locus. Only a few transformants were obtained, and diagnostic PCR indicated that the transforming fragments had integrated heterologously. This suggested that the tropomyosin GFP fusions might not be fully functional. To circumvent this problem we created, by fusion PCR, constructs to target full-length GFP tropomyosin fusion genes at the *yA* (yellow spore color) locus. For the N-terminal GFP fusion, the transforming fragment consisted of ~1000 base pairs of DNA upstream of *yA*, *AfpyrA* as a selectable marker, the *tpmA* promoter (500 base pairs), GFP, a 5 GA linker, the *tpmA* coding sequence and 1000 base pairs of *yA* downstream sequence. Insertion of this fragment into the *yA* locus deletes *yA* causing the spores produced by the transformant to be yellow. For the C-terminal fusion, the transforming fragment consisted of ~1000 base pairs upstream of *yA* followed by the entire *tpmA* gene with promoter, fused at its 3' end to a 5GA linker, the GFP coding sequence, *AfpyrA* as a selectable marker; and ~1000 base pairs downstream of *yA*. Correct insertion of this fragment also deletes *yA* causing yellow spore color. LO1540 was used as the recipient strain for transformation. Transformants were verified by diagnostic PCR and Southern hybridizations. We used two transformants carrying N-terminal fusions (LO2264 and LO2265) and two transformants carrying C-terminal fusions (LO2266 and LO2267). Primers are listed in Supplemental Table 1.

Fusion PCR was also used to tag actin at its N terminus with GFP. Three fragments were first amplified using primers actA-P1-actA-P6 (Supplemental Table 1). Primers actA-P1 and actA-P2 were used to amplify the 5' sequence upstream from the initiation codon and actA-P5 and actA-P6 to amplify the actin sequence. Both reactions used genomic DNA as template for amplification. Primers actA-P3 and actA-P4 amplified GFP. The three fragments were then subjected to fusion PCR using actA-P1 and actA-P6 to amplify the GFP-actin construct. The resulting GFP-actin construct incorporates a linker of Gly-Thr-Ala-Ser-Ala between the GFP and actin sequences. This construct was cotransformed into strain GR5 (*pyrG89*; *wA3*; *pyroA4*) by using *AfpyrG* to select transformants, which were subsequently screened visually for expression of GFP-actin by using standard methodologies. Western blot analysis was carried out to confirm expression of the GFP-actin chimera. The strain used for observation seems to be a diploid that formed spontaneously.

Imaging

Cells were grown and observed using four- or eight-chambered Lab-Tek chambered coverglasses (Nalge Nunc International, Rochester, NY). These consist of plastic growth chambers, with a removable cover, attached to a no. 1 coverslip. Aeration is excellent in these chambers and germlings and hyphae grow vigorously for long periods. Imaging was through the coverslips at the bottom of the chambers. Two IX71 inverted microscopes (Olympus, Tokyo, Japan) were used for imaging. One microscope was initially equipped with a mercury light source and a Uniblitz electronic shutter, a Prior Z-axis drive, an Olympus narrow blue (U-MNB2) filter cube, and a Hamamatsu Orca ER cooled charge-coupled device camera. Subsequently, the Uniblitz shutter was replaced with a Prior shutter and excitation filter wheel. With this arrangement, we used a Semrock GFP/DsRed-2X-A "Pinkel" filter set [459- to 481-nm bandpass excitation filter for GFP and a separate 546- to 566-nm bandpass excitation filter for mCherry, a dual reflection band dichroic (457-480 nm and 542-565 nm reflection bands, 500- to 529 and 584- to 679-nm transmission bands), and dual wavelength bandpass emission filter (500-529 nm for GFP and 584-679 nm for mRFP or mCherry imaging)]. Images were acquired with a 100× 1.3 numerical aperture (N.A.) planfluor objective or 60× 1.42 N.A. planapochromatic objective using Slidebook software (Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO) on an Apple PowerMac G4 computer (Apple Computer, Cupertino, CA). The other microscope was equipped with a Hamamatsu ORCA ERAG camera, Prior shutter, Prior excitation and emission filter wheels, and a Semrock GFP/DsRed2X2M-B dual band "Sedal" filter set [459- to 481-nm bandpass excitation filter for GFP and a 546- to 566-nm bandpass excitation filter for mRFP or mCherry, dual reflection band dichroic (457- to 480-nm and 542- to 565-nm reflection bands, 500- to 529-nm

and 584- to 679-nm transmission bands), and two separate emission filters (499–529 nm for GFP and 580–654 nm for mRFP or mCherry)]. Images were acquired using Slidebook software on a PowerMac G5 computer. Because of the greater selectivity between the two wavelengths, the dual filter wheel arrangement was used for most dual wavelength imaging. Some Z-series stacks were deconvolved using Slidebook software. Projections of Z-series stacks and Quicktime movies were made with Slidebook software.

For imaging, strains were grown in liquid minimal medium (6 g/l NaNO₃, 0.52 g/l KCl, 0.52 g/l MgSO₄·7H₂O, 1.52 g/l KH₂PO₄, 10 g/l D-glucose, 1 ml/l trace element solution [Cove, 1966], pH adjusted to 6.5 with NaOH before autoclaving), with appropriate supplements depending on nutritional markers in the strains.

Inhibitor Treatments

Cytochalasin A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was stored as a 1 mg/ml stock solution in dimethyl sulfoxide (DMSO), and latrunculin B (Sigma-Aldrich) was stored as a 10 mg/ml stock in DMSO. In time-lapse solvent-only control experiments, we found that if small amounts of DMSO were added to our observation chambers, the DMSO sank to the bottom of the chamber to the cells we were observing and it inhibited growth. To circumvent this problem, 300 μ l of growth medium was removed from the observation chamber and replaced with 300 μ l of growth medium into which an appropriate volume of inhibitor stock solution had been mixed. Using this procedure, growth was not inhibited at all in repeated (>10) DMSO-only control experiments. Cytochalasin A was used at a final concentration of 1.0 μ g/ml (2.1 μ M), and latrunculin B was used at a concentration of 40 μ g/ml (100 μ M). It is worth noting that we have used a much lower concentration of cytochalasin A than was used by Torralba *et al.* (1998). One of us has found that *A. nidulans* apparently degrades cytochalasin A such that low concentrations of cytochalasin A inhibit growth, but eventually growth inhibition ends. If low concentrations of cytochalasin A are added at intervals, growth inhibition is maintained (Oakley, unpublished data). Cytochalasin A is thus an effective inhibitor at low concentrations, but it is probably destroyed by *A. nidulans*. Regardless, the low concentration we used was sufficient to disassemble F-actin and completely stop growth. We prefer to use lower concentrations because they are less likely to have secondary effects. Benomyl was stored and used as reported previously (Horio and Oakley, 2005). For washout experiments, the culture medium containing the inhibitor was gently removed from the observation chambers with a transfer pipette and replaced with medium without inhibitor. This was repeated three to four times.

RESULTS

Localization and Imaging of Actin and Tropomyosin in Living *A. nidulans* Cells

Polarized growth in *A. nidulans* requires actin (Torralba *et al.*, 1998), and its location and dynamics are likely to be a key to tip growth. Actin has been visualized in fixed *A. nidulans* by immunofluorescence microscopy (Harris *et al.*, 1994, 1997; McGoldrick *et al.*, 1995; Torralba *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001), but it has not been imaged in living cells. We consequently constructed a strain expressing a fusion of GFP to the N terminus of actin (*A. nidulans* contains a single actin gene; Fidel *et al.*, 1988). The strain was healthy, growing, and conidiating normally at all temperatures, and the results with the anti-actin agents cytochalasin A and latrunculin B (see below) confirmed molecular biological evidence that the observed fluorescence was indeed due to actin.

The most conspicuous actin-containing structures are actin patches, and we were able to determine by analyzing Z-series stacks that they are located predominantly, and probably exclusively, at the hyphal cortex. In swollen isotropically growing conidia, they are simply scattered around the cortex. At the time of polarity establishment a few patches become associated with the germ tube emergence site (Figure 1A). In germlings and mature hyphae, they are concentrated near the hyphal tip as was observed previously (Harris *et al.*, 1994; Torralba *et al.*, 1998), but we found that the pattern changes as the germlings grow into mature hyphae. In germlings, the patches are simply concentrated near (but not restricted to) the apex (Figure 1B). For brevity, we use the term “tip” for the general tip region and “apex” for the extreme tip of the cell. As germ tubes extend and rounds of asymmetrical cell divisions occur, tip growth ac-

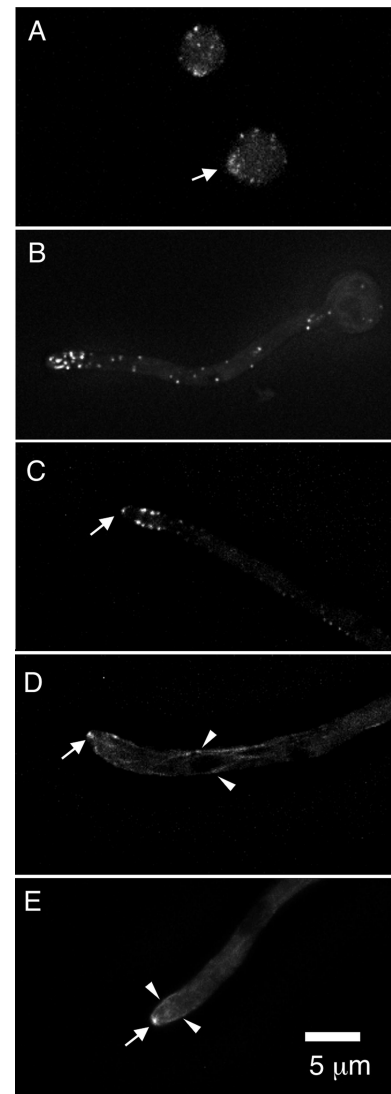


Figure 1. GFP-actin and GFP-tropomyosin localization. (A) A maximum intensity projection of a Z-series stack from a set of time-lapse images showing actin in two swollen conidia (asexual spores). In the lower conidium, the actin has accumulated (arrow) at a site at which germ tube emergence is occurring. (B) A maximum intensity projection of a Z-series stack through a germling. The remnant of the swollen conidium is visible at the right. GFP-actin patches are clustered near the tip and scattered behind the tip. (C) A single focal plane image of a rapidly growing tip cell. Because it is a single focal plane image rather than a projection, the cortical location of the actin patches is clear. Note the single actin spot at the hyphal apex (arrow). Such spots are presumably present in germlings, but they are difficult to distinguish among the actin patches. (D and E) Localization of N-terminally tagged tropomyosin at a growing hyphal tip. Tropomyosin localizes to the Spitzenkörper (arrows) and to microfilaments (some of which are designated with arrowheads). Microfilaments pass near the plasma membrane and extend past the region in which the collar of actin patches is found. Two such microfilaments are shown in E (arrowheads). All panels are the same magnification and were deconvolved to reduce background fluorescence.

celerates approximately fivefold (Horio and Oakley, 2005), and this is accompanied by a reorganization of actin patches into a prominent ring or collar 1–2 μ m behind the hyphal apex (Figure 1C). Actin patches are generally not present

anterior to this collar, but they are present at lower densities posterior to the collar.

In addition to the actin patches, hyphal tips (both germ-lings and hyphal tip cells) contained a single actin spot, fainter than the actin patches, at the apex (Figure 1C) at the position of the Spitzenkörper (discussed below). This structure has not been revealed previously by immunofluorescence microscopy, but a meshwork of actin filaments has been seen in this position by freeze-substitution electron tomography (Hohmann-Marriott *et al.*, 2006). We were not able to visualize extended actin filaments (cables). In previous studies, these have been difficult to image, but they have been visualized by immunofluorescence (Harris *et al.*, 1994; Araujo-Bazán *et al.*, 2008) and by using a GFP-tropomyosin fusion (Pearson *et al.*, 2004). As reported previously (Harris *et al.*, 1994; Torralba *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001), actin was also associated with forming septa (data not shown).

Time-lapse microscopy revealed that the actin patches were highly dynamic (see Supplemental Video1.mov). They moved both toward and away from the apex and formed and disappeared rapidly. Indeed, they were sufficiently dynamic that it was difficult to follow them long enough to determine their life span with precision. It is safe to say, however, that the average life span of an actin patch at 25°C is a few seconds, certainly less than a minute. Importantly, as the hyphal tip grew, the ring of actin patches stayed approximately the same distance from the apex. This implies that although individual actin patches are highly dynamic, their movement is somehow coordinated with tip growth or that the hyphal apex and the ring of patches are physically linked.

A tropomyosin (*tpmA*) GFP fusion has been used to image actin cables (Pearson *et al.*, 2004), and because we were unable to image cables with our GFP-actin fusion, we constructed both N-terminal and C-terminal tropomyosin GFP fusions. We found that tropomyosin was concentrated near the apex and at forming septa as reported previously (Pearson *et al.*, 2004). Deconvolution of z-axis series stacks revealed, additionally, that the tropomyosin at the apex is mainly concentrated in the Spitzenkörper and in cables extending back from the apex (Figure 1, D and E). The cables often ran very near the plasma membrane at the tip (Figure 1E), and there was sometimes brighter tropomyosin fluorescence in this area, perhaps reflecting multiple cables very close to each other. As expected, tropomyosin did not seem to be a component of actin patches, but actin/tropomyosin cables did run very close to plasma membrane in the region of the collar of actin patches.

Localization of a Vesicular SNARE, a Target SNARE, and the *A. nidulans* Homologue of Actin Binding Protein 1 in Living Cells

A key aspect of polarized hyphal growth is the apical release of cell wall biosynthetic and remodeling enzymes and cell wall precursors from the cytoplasm by exocytosis. This is critical for the mechanics of hyphal growth, and it is postulated to be critical for the establishment of the hyphal shape (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989; Bartnicki-Garcia, 1990; Gierz and Bartnicki-Garcia, 2001). Exocytosis presumably creates an excess of membrane at the tip that must be internalized by endocytosis (Read and Kalkman, 2003). To understand how tips grow, it is thus necessary to know where exocytosis and endocytosis occur. In *S. cerevisiae*, actin patches are known to be sites of endocytosis (reviewed by Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003). A prototypic component of these endocytic patches is actin binding protein 1 (Engqvist-Goldstein and Drubin, 2003; Kaksonen *et al.*, 2003, 2005;

Huckaba *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2006). The gene encoding the *A. nidulans* homologue of actin binding protein 1 has been identified by Araujo-Bazán *et al.* (2008) and designated *abpA*. We used an mRFP fusion to the C terminus of the *abpA* product (here designated ABPA) (Araujo-Bazán *et al.*, 2008) to observe its location in living cells, and we found that its location was indistinguishable from that of actin (with a collar of ABPA-mRFP behind the tips of rapidly growing hyphae; Figure 2, B and C) except that we did not observe an ABPA-mRFP spot at the hyphal apex. The fact that the collar of patches contains both actin and ABPA is consistent with them being endocytic sites. Additional evidence that they are endocytic patches has been obtained by Araujo-Bazán *et al.* (2008).

The polarized delivery of secretory vesicles to the plasma membrane involves mechanisms by which SNARE proteins in the membrane of secretory vesicles are efficiently recycled to reenter the exocytic pathway. In budding yeast, the SNC1/SNC2 pair of R-SNARE (a form of v-SNARE) paralogs encodes fungal homologues of mammalian synaptobrevin proteins. Snc1p/Snc2p are exocytic SNAREs involved in the fusion of secretory vesicles with the plasma membrane (Protopopov *et al.*, 1993). Snc1p is recycled from the plasma membrane by endocytosis and subsequently retrieved to the Golgi from an early endosomal compartment (Lewis *et al.*, 2000). An *A. nidulans* SNC1 homologue should thus be an excellent marker for both exocytosis and endocytosis at the growing tip.

The yeast Qa SNARE Sso1p is a target (t)-SNARE that serves as a membrane-specific tag in the docking of transport vesicles to the plasma membrane (Aalto *et al.*, 1993). Sso1p is not a substrate of the endocytic recycling pathway, and its distribution in the plasma membrane is not significantly polarized in yeast (Valdez-Taubas and Pelham, 2003). It is thus likely to be an excellent marker for the plasma membrane. The *A. nidulans* single SNC1 and SSO1 homologues are AN8769.3 and AN3416.3, respectively (using the Broad Institute gene designations at http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_nidulans/Home.html). We now designate the *A. nidulans* SNC1 homologue *synA* and the SSO1 homologue *ssoA*, by using standard *A. nidulans* nomenclature, and we designate the products of these genes SYNA and SSOA. (*sncA* is a more obvious designation for the SNC1 homologue, but this designation has been used for another *A. nidulans* gene.) We note that AN3416.3 is incorrectly annotated in the genome database. The correct gene structure was determined using cDNA sequence coverage available in expressed sequence tag databases.

To observe SYNA and SSOA at the tips of living hyphae, we wanted to generate strains expressing GFP and mCherry protein fusions of these proteins by using gene replacements. Functional tagging of SNAREs requires attachment of the fluorescent proteins to their N termini because SNAREs usually contain a single C-terminal transmembrane domain such that their C termini are in or very near the membrane in which they are embedded (Ungar and Hughson, 2003). However, we wanted to retain the endogenous promoters for these genes to avoid any problems arising from nonphysiological levels of expression. Although fusion PCR allows rapid production of transforming fragments, procedures to date involve C-terminal tagging of the target proteins (Yang *et al.*, 2004). We consequently developed a novel five-piece fusion PCR procedure that allowed us to make appropriate transforming constructs with N-terminal fluorescent protein fusions expressed under the control of the normal promoters (discussed in *Materials and Methods*

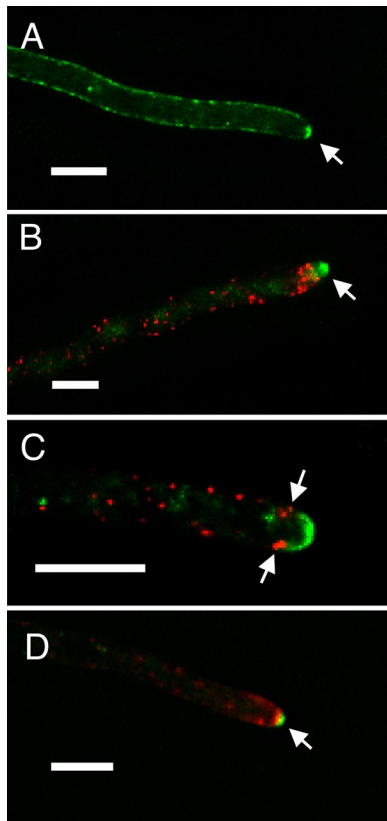


Figure 2. Localization of SSOA, SYNA, ABPA, and SECC in living cells. (A) Hyphal tip cell expressing GFP-SSOA. The image is from a Z-series stack (0.5- μ m vertical spacing between captures) that has been deconvolved. The image is a maximum intensity projection image of three consecutive sections. SSOA is predominantly at the plasma membrane, and there is a region of greater SSOA concentration at the hyphal apex (arrow) and a region of reduced concentration immediately posterior to the apical SSOA patch. The SSOA is not evenly distributed through the plasma membrane but has a patchy or punctate distribution. (B) ABPA-mRFP (red) and GFP-SYNA (green). It is a maximum intensity projection of a deconvolved Z-series stack (0.5- μ m vertical spacing between captures) through the entire hyphal tip cell. The threshold for the green channel was chosen such that the Spitzenkörper is clear (arrow), but the GFP-SYNA at the membrane anterior to the ABPA patches is less clear. The ABPA patches form a collar around the hypha behind the apex and the Spitzenkörper. (C) A single optical section of a hyphal tip cell expressing GFP-SYNA and ABPA-mRFP. The Spitzenkörper was not particularly prominent in this cell, and it was mainly located in a different optical plane. This allows the SYNA localization at the plasma membrane to be seen clearly. SYNA is at the plasma membrane between the apex and the collar of ABPA patches. In this focal plane, four ABPA patches from the collar are visible (arrows). There is a particularly prominent internal SYNA-containing structure that seems too large to be a vesicle immediately posterior to the top patches. SYNA-containing structures varied considerably in size, and we speculate that this could be a Golgi apparatus or endosome. The cortical location of the ABPA patches is evident near the tip. The hypha, however, is at a slight angle relative to the plane of optical section, and this makes some of the ABPA patches seem internal, although they are, in fact, cortical. The ABPA patches further away from the tip are actually at the surface of the cell nearest the reader. (D) mCherry-SYNA (red) and SECC-GFP (green). SECC, an exocyst component, localizes to the apex (arrow). Bars, 5 μ m.

and shown in Supplemental Figure 1). These constructs were transformed into an *A. nidulans* strain and the correct

gene replacement events were verified by diagnostic PCR and Southern hybridizations (data not shown). The GFP and mCherry fusions of each protein gave the same localization patterns as each other and the strains carrying the fusions were healthy, showing no evidence of reduced growth at any temperature or alteration of conidiation. Multiple transformants were observed for each fusion, and they gave the same localization pattern. The following conclusions are based on observations of many single-time point Z-series stacks and time-lapse data sets.

The fluorescence signal of GFP-SSOA was weaker than that of our other fluorescent fusion proteins. As expected, it localized to the plasma membrane (Figure 2A), but the fluorescence was not completely uniform in the membrane; rather, it was patchy. This is in marked contrast with the uniform localization of GFP-Sso1 in the *S. cerevisiae* plasma membrane. Interestingly, we generally found a small region of higher concentration (i.e., brighter GFP fluorescence) at the hyphal apex and a region of lower concentration immediately behind the apical SSOA patch (Figure 2A).

The GFP-SYNA fusion protein would be expected to localize to secretory vesicles and during exocytosis, as the vesicles fuse with the plasma membrane, GFP-SYNA should become incorporated into the plasma membrane. SYNA was, indeed, found at dots in the hypha, many of which undoubtedly correspond to such vesicles. (Note that there are also some larger SYNA-containing structures that could correspond to larger endosomal compartments; see below.) The Spitzenkörper (“apical body” or “tip body” in English) is an incompletely defined structure observed at the tips of growing hyphae in many fungi that is thought to be critically important for tip growth (recently reviewed by Harris *et al.*, 2005), and vesicles are a major component of the Spitzenkörper. Thus, one would expect GFP-SYNA to reveal the Spitzenkörper, and, indeed, in rapidly growing hyphal tips a vesicle cluster or Spitzenkörper was visible (Figure 2B). Four-dimensional image sets (Z-series captured over time) revealed that the size and brightness of the Spitzenkörper fluctuated to some extent as hyphae grew. The Spitzenkörper was at the apex, and as it shifted to one side or another, the direction of hyphal growth followed (Supplemental Video2.mov). It is interesting to note, however, that in germlings GFP-SYNA localization gave no evidence for a Spitzenkörper.

Most interesting was the location of GFP-SYNA at the hyphal tip. Z-series stacks revealed that SYNA was located at the plasma membrane in a hemisphere extending from the hyphal apex back to the ring of actin/ABPA patches (Figure 2C). Although the resolution of light microscopy does not allow one to determine whether SYNA is embedded in the membrane or just in contact with the membrane, the biology of R-SNARES argues strongly that SYNA is a component of the plasma membrane in this region. For example, in *S. cerevisiae*, an epitope-tagged version of Snc1 has previously been shown to be present largely in the plasma membrane (Protopopov *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 2000; Valdez-Taubas and Pelham, 2003).

It is important to note that in *A. nidulans* SYNA was not detected at the plasma membrane posterior to the collar of actin/ABPA patches. This indicated that exocytosis occurs predominantly, and perhaps exclusively, anterior to this collar. To obtain a clearer picture of the site(s) of exocytosis, we identified, tagged and imaged the *A. nidulans* homologue of the *S. cerevisiae* SEC3 gene. Sec3p, a component of the exocyst, is a landmark for the site of polarized exocytosis (Finger *et al.*, 1998). A blast search of the *A. nidulans* database revealed a single, unambiguous SEC3 homolog (e value

2e⁻²⁷), AN0462.3 (Broad database designation). We designate this gene *secC* and its product SECC. We created a fusion of GFP to the C terminus of SECC, and we found that it localized consistently to a small region at the plasma membrane at the apex, immediately anterior to the Spitzenkörper (Figure 2D). This indicates that exocytosis occurs at, and is probably restricted to, a very small region at the apex of the growing hypha.

From multiple time-lapse image sets, it is clear that the actin at the apex, the Spitzenkörper, the region of SYNA at the membrane, SECC, and the actin/ABPA patches all move forward together as the tip grows and constitute some form of complex (Supplemental Video2.mov). For brevity, we call this the “tip growth complex.”

Effects of the Anti-Actin Agents Cytochalasin A and Latrunculin B on Actin Patches, Cables, and the Tip Growth Complex

To clarify the role of actin in tip growth, we treated hyphae with cytochalasin A, which has been shown to depolymerize filamentous actin (F-actin) in *A. nidulans* (Torralba *et al.*, 1998), and with latrunculin B, another F-actin depolymerizing agent. The results obtained with the two compounds were essentially identical. The subapical actin patches and the actin spot at the hyphal apex disappeared immediately (<5 min). Tip growth stopped almost immediately (<10 min), and the hyphal tips bulged slightly (Figure 3, Supplemental Video3.mov and Video4.mov, and Supplemental Figure 2).

Cytochalasin A and latrunculin B effects on hyphae expressing ABPA-mRFP and GFP-SYNA were similar but not identical to each other. With cytochalasin A, the ABPA patches did not disappear but they became delocalized. They initially collapsed toward the tip of the hypha (Figure 4D). Subsequently, they remained cortical but became distributed, apparently randomly, through the cortex (Figure 4G). Imaging of GFP-SYNA revealed that the vesicular clus-

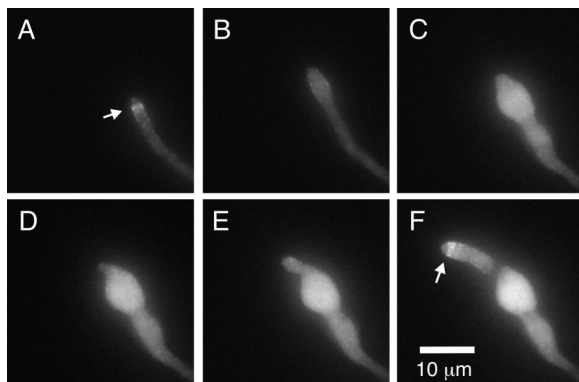


Figure 3. Cytochalasin A treatment and washout in a strain expressing GFP-actin. These are maximum intensity projections of Z-series stacks from a time-lapse data set (see Supplemental Video3.mov). (A) GFP-actin localization in a hyphal tip immediately before cytochalasin A addition. The collar of actin patches is visible (arrow). (B) Fifteen minutes after cytochalasin A addition and immediately before cytochalasin A washout. Actin patches have dissolved, and the tip has swollen. (C) Seventy minutes after cytochalasin A washout. The tip has swollen further. (D) Eighty minutes after cytochalasin A washout. A hyphal tip has emerged. (E) Ninety minutes after cytochalasin A washout. The hyphal tip has begun to extend. (F) One hundred minutes after cytochalasin A washout. A collar of actin patches has reformed (arrow). The new hypha is larger in diameter than the hypha before cytochalasin A treatment.

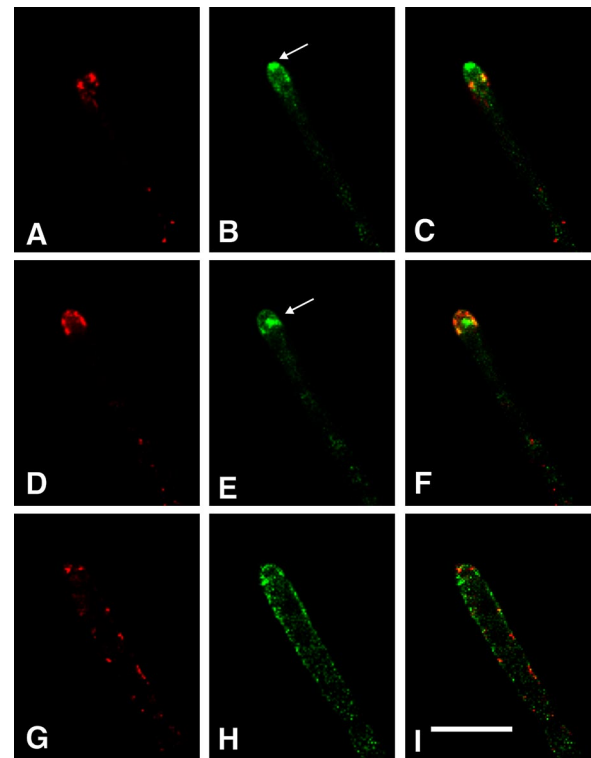


Figure 4. GFP-SYNA and ABPA-mRFP in a cytochalasin A-treated hypha. Each frame is a single focal plane image from deconvolved Z-series stacks taken as part of a time-lapse series. A, D, and G show ABPA-mRFP. B, E, and H show GFP-SYNA. C, F, and I are color composites. (A–C) A hyphal tip immediately before cytochalasin A addition. The Spitzenkörper is designated with an arrow in B. GFP-SYNA is in the Spitzenkörper, and vesicles are in the hypha (fainter) and at the plasma membrane between the hyphal apex and the collar of ABPA patches. (D–F) The same hyphal tip 5 min after cytochalasin A addition. The vesicular cluster of the Spitzenkörper has floated back from the hyphal apex (arrow in E), and the ABPA-mRFP patches have moved to the tip area (D). (G–I) The same hypha 1 h after cytochalasin A addition. GFP-SYNA now occupies a larger area of the plasma membrane at the tip region (H), although the fluorescence signal is weaker, indicating less GFP-SYNA per unit area. mRFP-ABPA is now apparently randomly distributed in the cortex (G). Bar (I), 10 μ m.

ter that is integral to the Spitzenkörper generally disappeared rapidly. Occasionally, however, it drifted away from the hyphal apex and remained visible for a few minutes before disappearing (Figure 4E). This seems to indicate that this cluster has some degree of structural integrity and that its localization at the apex is F-actin dependent. GFP-SYNA remained at the plasma membrane near at the hyphal tip, but, notably, the membrane area to which it localized increased with time (Figure 4H).

With latrunculin B treatment, ABPA patches did not immediately disappear but, after initial delocalization of the patches, a portion of ABPA-GFP localized to the cytosol apparently at the expense of the cortical patches, which became less apparent. Some ABPA-mRFP localized to the membrane in the swollen tip area as uniform fluorescence rather than patches. GFP-SYNA localization was similar to that in cytochalasin A-treated cells (Figure 5 and Supplemental Video4.mov).

The effects of both cytochalasin A (Figure 3 and Supplemental Video3.mov and Video5.mov) and latrunculin B (Supplemental Video 6.mov) were reversible, although the

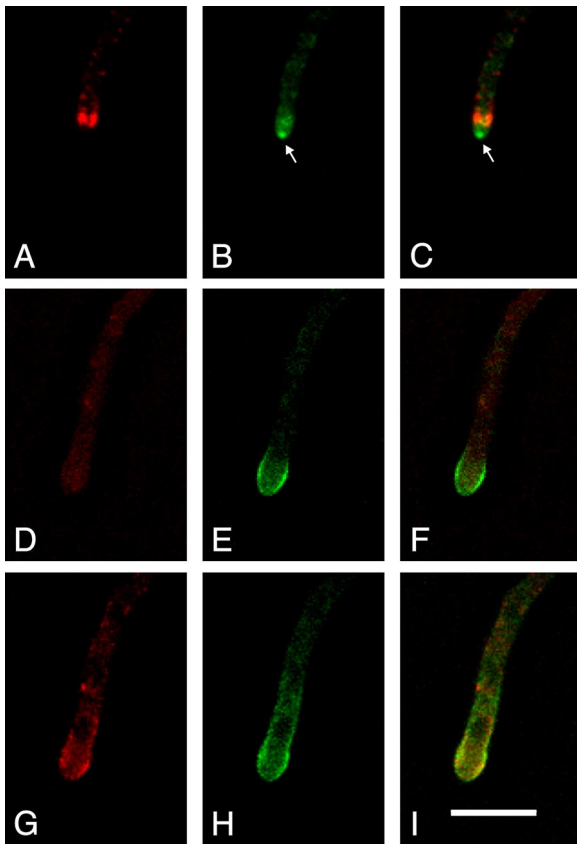


Figure 5. GFP-SYNA and ABPA-mRFP in a latrunculin B treated hypha. Each frame is from deconvolved Z-series stacks taken as part of a time-lapse series (see Supplemental Video4.mov). A, D, and G show ABPA-mRFP. B, E, and H show GFP-SYNA. C, F, and I are color composites. (A–C) A single focal plane image of a hyphal tip taken 10 min before latrunculin B addition. The Spitzenkörper is designated with an arrow. GFP-SYNA is in the Spitzenkörper and in vesicles near the tip and further back in the hypha. In this case, there are so many vesicles in the vicinity of the tip that it is difficult to distinguish the GFP-SYNA at the membrane in the region between the apex and the ABPA patches from the vesicles. (D–F) A single focal plane image of the same hyphal tip 15 min after latrunculin B addition. The tip has bulged and the ABPA-mRFP patches have dispersed. The GFP-SYNA at the membrane is now clearly visible because there are fewer vesicles in the tip area and it occupies a larger area than before latrunculin B addition. (G–I) A projection of two consecutive Z-series images of the same hypha 60 min after latrunculin B addition. GFP-SYNA now occupies a larger area of the plasma membrane at the tip region (H), although the fluorescence signal is weaker, indicating less GFP-SYNA per unit area. Bar (I), 10 μ m.

reversal was not rapid. When these compounds were washed out of the culture chambers, normal growth and organization of actin, ABPA, and SYNA were restored, although restoration of tip growth often took >1 h. When cytochalasin A or latrunculin B was washed out, the swollen tip exhibited additional swelling, and then one or more hyphal tips eventually emerged and extended. (Figure 3 and Supplemental Video3.mov, Video5.mov, and Video6.mov). The hyphal tips that emerged were often larger than those seen before treatment.

We also observed the effects of cytochalasin A on actin cables by using our GFP-tropomyosin fusion. As expected, actin cables disassembled rapidly upon addition of cytocha-

lasin A, and they were undetectable 5 min after cytochalasin A addition.

Effects of Antimicrotubule Agent Benomyl on Tip Growth and the Tip Growth Complex

Horio and Oakley (2005) have studied the effects of the antimicrotubule agent benomyl on tip growth. From these and previous studies (e.g., Oakley and Morris, 1981), it is clear that benomyl is an excellent antimicrotubule agent in *A. nidulans*. It causes rapid microtubule disassembly (all microtubules disassemble in <10 min after addition to the culture chamber), it is rapidly reversible (microtubules begin to reassemble in <5 min after benomyl is washed out), and it is quite specific for microtubules (Oakley and Morris, 1981). Treatment with benomyl caused a dramatic reduction in tip growth rate but not a complete stoppage of growth (Horio and Oakley, 2005). It was also noted that benomyl treatment led to growth away from the tip. Side branches were sometimes formed, and there were sometimes bulges in the hyphae.

We have extended these observations with time-lapse microscopy documenting the effects of benomyl on tip growth and the localization of actin, ABPA and SYNA. We first verified that benomyl was depolymerizing microtubules as expected using a GFP- α -tubulin fusion (Horio and Oakley, 2005). After benomyl addition, as noted previously, growth of the tip slowed. In addition, side branches often formed in the tip cell, whereas side branches never formed in the tip cells of controls. In benomyl, growth was often highly curved both at the hyphal tip and at the tips of side branches (Figure 6).

When hyphae expressing GFP-actin were treated with benomyl, the actin patches remained visible as expected, but their distribution often changed significantly over time. The change in distribution was not identical among treated hyphae, but there were some common themes. In most hyphae, the tip growth apparatus, as imaged by GFP-actin or ABPA-mRFP and GFP-SYNA, was eventually displaced from the tip. In some cases, the displacement was rapid, whereas in other cases the tip growth apparatus remained intact and in place for as much as an hour (Supplemental Video7.mov). In some cases when the tip growth apparatus was displaced from the tip, growth of one or more side branches started almost immediately, and at least a rudimentary tip growth apparatus was present at the growing side branches. In these cases, the tip growth apparatus was often less organized than in rapidly growing tip cells and resembled that of germlings. In other cases, the tip growth apparatus disassembled and did not reform during the observation period of >1 h. The effects of benomyl were rapidly reversible. We found that within 10 min of benomyl washout, normal, directional tip growth resumed (Figure 6), and it was accompanied by the typical arrangement of actin/ABPA patches (Figure 6) and SYNA (data not shown) seen at rapidly growing tips.

DISCUSSION

A. nidulans Possesses a Dynamic but Structured Tip Growth Apparatus

Our results reveal that, in rapidly growing hyphae, the Spitzenkörper, the ring of actin/ABPA patches, the region of SYNA at the plasma membrane, SECC, and the actin spot at the apex are maintained in a consistent spatial relationship with each other and with the hyphal apex. Published data suggest that the polarisome and a region of spingolipids also maintain a consistent spatial relationship with these struc-

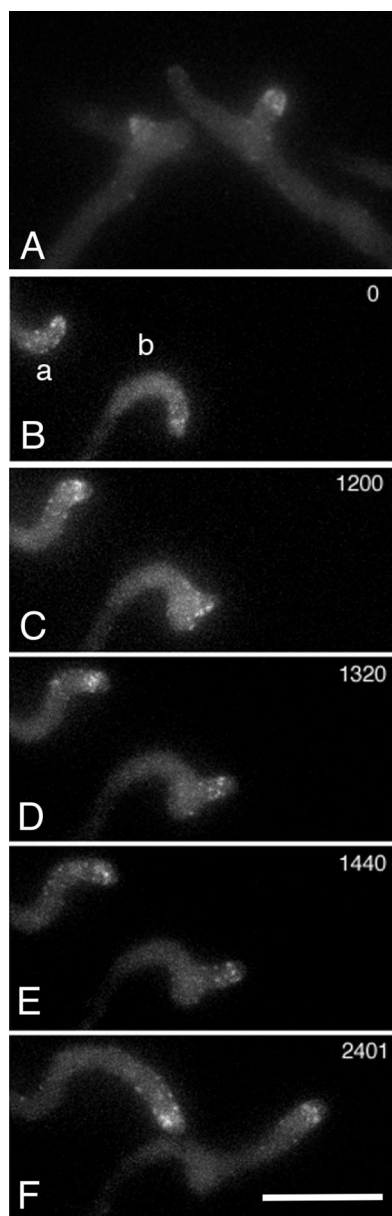


Figure 6. Benomyl treatment and recovery in a strain expressing GFP-actin. (A) Abnormal branching after benomyl treatment. Lateral branching does not normally occur in the tip cell. (B–F) Recovery of a different pair of hyphae after benomyl washout. The time after benomyl washout (in seconds) is given at the upper right of each panel. At $T = 0$, the hyphal tips display obvious curvature. Over time, the actin patches become more organized and the hyphal tip displays more rapid and straighter growth. Bar (F), 10 μm .

tures and the apex (Sharpless and Harris, 2002; Harris *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). We suggest that rather than thinking of these structures as separate entities, it is useful to think of them as components of a highly structured tip growth apparatus in which the positions of individual components are precisely maintained to achieve efficient tip growth. Although highly structured, this apparatus is also highly dynamic in two senses. First, it moves as the tip grows. The tip shown in Supplemental Video2.mov, for example, grew at $\sim 1 \mu\text{m}/\text{min}$ and the entire apparatus thus had to move forward at this rate while maintaining the spatial relationships of its components. Second, individual components are

highly dynamic. For example, the actin/ABPA patches are extremely dynamic. They move forward and backward and appear and disappear with a half-life of $< 1 \text{ min}$, similar to their behavior in *S. cerevisiae* (Smith *et al.*, 2001; Kaksonen *et al.*, 2003). Although individual patches are quite dynamic, the position of the collar as a whole is relatively stable. There must be a mechanism for establishing the collective position of the patches while allowing individual patches to move forward and backward, to assemble and to disappear. The formin SEPA, a component of the polarisome, is also dynamic (Sharpless and Harris, 2002), exocytic vesicles are dynamic, and, indeed, it is likely that many other components of the tip growth apparatus will be found to be dynamic.

Our data strongly indicate that the tip growth apparatus is held together by actin cables. First, the actin cables are perfectly positioned to connect the components of the tip growth apparatus. Second, treatment with cytochalasin A or latrunculin B caused the cables to disassemble and the components of the tip growth apparatus to lose their spatial relationship. Moreover, the tip growth apparatus fell apart in an interesting way after treatment with actin depolymerizing agents. After treatment, the vesicular cluster of the Spitzenkörper sometimes drifted away from the apex before it disassembled, and this indicates that F-actin plays a role in tethering this cluster to the apex as well as being essential for maintaining the integrity of the Spitzenkörper. After treatment, actin/ABPA patches also became delocalized. This was true for cytochalasin A treatments and latrunculin B treatments, but it was more obvious with cytochalasin A treatments because the ABPA patches were visible for longer after treatment. It is worth noting that actin cables interact with endocytic patches, and they are involved in their movement in *S. cerevisiae* (Huckaba *et al.*, 2004), so it is not surprising that actin cables seem to be involved in the positioning of the actin/ABPA patches in *A. nidulans*. Finally, it is also worth noting that actin is essential for the localization of SEPA (Sharpless and Harris, 2002), another component of the tip growth apparatus.

The organization of the tip growth apparatus correlated with the tip growth rate. In *A. nidulans*, conidia germinate, and after a short period of isotropic growth, they form germ tubes. Repeated rounds of nuclear division followed by asymmetric cell division lead to the formation of tip cells with many nuclei that grow much more rapidly than germings (discussed by Horio and Oakley, 2005). As discussed, hyphal tip cells have very structured tip growth apparatuses. We have found, however, that in germings, which have relatively slow growth rates, there is no obvious, structured tip growth apparatus. Actin/ABPA patches are simply clustered near the tip, and there is no obvious Spitzenkörper. This suggests that the tip growth apparatus is not strictly required for growth, but that it has been developed by fungi to allow the impressively rapid growth rates they exhibit.

Exocytosis, Endocytosis, and Hyphal Morphogenesis

Exocytosis and endocytosis are essential for tip growth, and one can think of the tip growth apparatus as simply a machine for delivering exocytic vesicles to the correct place and for recycling membrane and other vesicular components. The sites of exocytosis are also postulated to determine the shape of the growing hypha (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989; Bartnicki-Garcia, 1990; Gierz and Bartnicki-Garcia, 2001); thus, it was of particular interest to follow membrane trafficking by using fusion proteins of the synaptobrevin homologue SYNA, an exocytic SNARE (Gerst, 1997). Given

that SYNA is a member of a family of prototypic markers for exocytic vesicles (Protopopov *et al.*, 1993; Gerst, 1997; David *et al.*, 1998), it is strongly predicted to be a component of exocytic vesicles that becomes a transient component of the plasma membrane when exocytosis occurs, and then is recycled by endocytosis. Completely consistent with these predictions, we have found that SYNA localizes to small dots in the cytoplasm, to the Spitzenkörper and to the plasma membrane at the hyphal apex. The localization at the plasma membrane survives treatments with cytochalasin A and latrunculin B, which is consistent with the notion that SYNA is embedded in the plasma membrane rather than just being in vesicles near the membrane. The fact that the SYNA association with the plasma membrane was only seen in a more or less hemispherical region between the apex and the collar of actin/ABPA patches indicates to us that most, perhaps all, exocytosis occurs in this region. The vesicle density in the tip region is too high to allow us to observe individual exocytotic events so we cannot define the sites of exocytosis more precisely using GFP-SYNA. We have, however, tagged SECC, the homologue of a highly conserved exocyst component, and it localizes to a small region of the plasma membrane at the apex. These data in combination argue very strongly that the great majority of exocytosis occurs in a small region anterior to the collar of actin/ABPA patches, and it probably occurs in the small region defined by SECC-GFP localization. These data do not seem to be particularly supportive of the most current models for morphogenesis in which hyphal shape is determined by radial movement of vesicles from the Spitzenkörper (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1989; Bartnicki-Garcia, 1990; Gierz and Bartnicki-Garcia, 2001). Such models predict that exocytosis would occur over a broader region than our data indicate.

The fact that there is a great deal of SYNA at the Spitzenkörper is supportive of the widely held notion that the Spitzenkörper is a vesicle supply center, a place where exocytic vesicles containing wall precursors accumulate before fusion with the plasma membrane. It is worth noting, however, that we find no evidence that the Spitzenkörper is present in short germlings. Thus, the Spitzenkörper may be an adaptation for rapid growth rather than a requirement for growth or for the establishment of hyphal shape.

Polarized growth in *A. nidulans* clearly requires F-actin (Torralba *et al.*, 1998; this study), and an obvious model is that the docking of vesicles with the plasma membrane at the tip requires movement of vesicles along F-actin cables. Our tropomyosin localization data reveal that F-actin cables are well positioned to move vesicles to the Spitzenkörper. Our data on localization of SYNA after cytochalasin A and latrunculin B treatments are also consistent with this model in that we find no evidence of polarized exocytosis after actin depolymerization. We sometimes noted a slight bulging of tips after cytochalasin A and latrunculin B treatment (Figure 5), and it is possible, consequently, that some non-polarized exocytosis can occur in the absence of actin. It has been shown biochemically, however, that cytochalasin A inhibits secretion in *A. nidulans* (Torralba *et al.*, 1998) and that a myosin I homologue, MYOA, plays some role in secretion in *A. nidulans* (McGoldrick *et al.*, 1995). In our own cytochalasin A and latrunculin B washout experiments, we found that there was often rapid isotropic growth of hyphal tips after washout and before polarity was established (Figure 3, Supplemental Video5.mov and Video6.mov). These data together indicate that actin is important to the rate of exocytosis, not just the site of exocytosis.

Once secretory vesicles fuse with the plasma membrane and release their contents, excess membrane and compo-

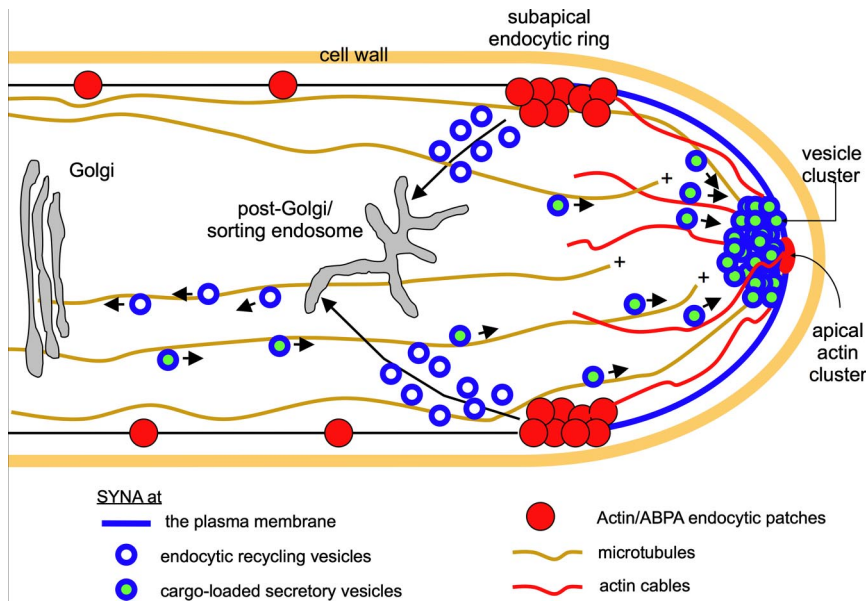
nents of the vesicle fusion machinery such as SYNA need to be recycled by endocytosis (Pelham, 1999; Fischer-Parton *et al.*, 2000; Lewis *et al.*, 2000; Read and Kalkman, 2003; Valdez-Taubas and Pelham, 2003). What are the sites of endocytosis at growing hyphal tips? In *S. cerevisiae*, there is compelling evidence that actin patches are sites of endocytosis, and there is a great deal of evidence that this is the case in *A. nidulans* as well. Araujo-Bazán *et al.* (2008) provide equally compelling evidence that the cortical actin/ABPA patches in *A. nidulans* contain the components of the endocytic machinery (including but not limited to ABPA). Endocytosis of the fluorescent membrane marker N-[3-triethylammoniumpropyl]-4-[p-diethylaminophenyl]hexatrienyl pyridinium dibromide (FM4-64) requires actin (Penalva, 2005), and when FM4-64 is taken up, it initially localizes to organelles resembling actin patches. MYOA is important for endocytosis in *A. nidulans*, and GFP-MYOA localizes to cortical patches in vivo (Yamashita and May, 1998). Our data show that there is SYNA at the plasma membrane anterior to the actin/ABPA collar, but no SYNA at the plasma membrane posterior to the actin/ABPA collar. It follows that as the hypha grows SYNA is removed from the plasma membrane at the actin/ABPA collar.

Our data suggest a very obvious model for endocytosis and exocytosis at the growing tip. Exocytic vesicles fuse with the plasma membrane in a region anterior to the actin/ABPA collar (probably the region defined by SECC localization), releasing cell wall precursors. Vesicle components such as membrane and SYNA become incorporated into the plasma membrane. As the tip grows, the actin/ABPA collar moves forward and removes SYNA, membrane, and presumably other vesicle components from the plasma membrane by endocytosis. These components are then recycled. We suggest that the actin/ABPA patches posterior to the collar are involved in endocytosis for other purposes such as nutrient uptake.

Functions of Cytoskeletal Elements

Our data, in combination with published data cited above, indicate that actin has at least three functions in tip growth. First, as discussed, it is involved in exocytosis ahead of the actin/ABPA collar. This must involve the movement of exocytic vesicles and may involve the actual fusion of the vesicles with the plasma membrane. Second, it is required for endocytosis at the actin/ABPA patches. Third, it is involved in maintaining the structure of the tip growth complex.

Microtubules must also have at least three roles in tip growth, two of which may be closely related. The available evidence suggests that they are involved in long-range transport of vesicles to the hyphal tip region (Horio and Oakley, 2005, and other data discussed therein; Lenz *et al.*, 2006). Note that there is considerable evidence that microtubules are extremely dynamic at the hyphal tip (Han *et al.*, 2001; Szweczyk, Symeonidou-Sideris, and Oakley, unpublished data), continually growing and shrinking. They are thus not in stable contact with the Spitzenkörper and vesicles probably fall off of microtubules in the tip area more often than they are delivered directly to the Spitzenkörper. Microtubules are also required for the maintenance of directionality of tip growth because disassembly of microtubules leads to pronounced curvature of growth. Third, microtubules are required for keeping the tip growth apparatus in position at the tip. Over short periods, the tip growth apparatus generally stays at the tip, but without microtubules it often disappears from the tip and reforms elsewhere in the hyphal tip cell, correlating with, and presumably causing, formation of a lateral branch. Sometimes two or more lateral



components from the plasma membrane and incorporating them into endocytic vesicles for recycling. Although we do not have direct evidence, information from other systems and from Peñalva, Rodríguez and Arenza (personal communication) indicates that these vesicles move to the post-Golgi sorting endosome by mechanisms that are not yet defined. From this compartment, SYNA-containing membranes move away from the tip on microtubules, powered by dynein, to be eventually incorporated into Golgi-derived secretory vesicles containing cell wall biosynthetic enzymes and wall precursors.

branches form, each with their own tip growth apparatus. These findings are in keeping with previous findings that indicate that microtubules and associated motors are important for the directionality of growth and maintenance of the Spitzenkörper in *A. nidulans* and other filamentous fungi (Lehman, 1995; Riquelme *et al.*, 2000, 2003; Konzack *et al.*, 2005). Maintenance of direction of growth and position of the tip growth apparatus are probably aspects of the same function. Microtubules normally keep the tip growth apparatus in the correct position at the tip; thus, growth is more or less directional. Without microtubules, the tip growth apparatus can move off center causing curved growth or it can be displaced out of the hyphal tip area causing lateral growth.

An Integrated Model for Hyphal Tip Growth

Together, all of these data lead us to the following testable model (Figure 7). Secretory vesicles are transported by kinesins (including type 3 kinesins; Lenz *et al.*, 2006) on microtubules to the tip region where they leave the microtubules and become associated with actin cables, the assembly of which is nucleated by the formin SEPA. Vesicles could fall off the microtubules and then become attached to myosin before moving along actin cables; alternatively, they could be transferred directly from microtubules to actin cables. We note that recent data on vertebrate myosin Va indicate that it is a wonderful candidate for transferring vesicles from microtubules to actin filaments (Ali *et al.*, 2007). Vesicles are then moved on actin cables into a cluster at the Spitzenkörper where they are stored briefly before exocytosis, which occurs when vesicles are brought, perhaps on short actin cables, to the exocytotic complex at the apex. Exocytosis releases components required for the synthesis of new wall. SYNA (and, we presume, other components of the vesicular membrane) becomes incorporated into the plasma membrane during exocytosis. SYNA remains in the membrane

Figure 7. A model for tip growth in *A. nidulans*. The Spitzenkörper is not specifically labeled but includes (but is not necessarily limited to) the vesicle cluster and the apical actin cluster as well as the apical SSOA patch, SECC, and apical SEPA, which are not shown. Secretory vesicles containing components necessary for tip growth are transported toward the tip along microtubules powered by kinesin molecules (data not shown). The + ends of microtubules are extremely dynamic. In some cases, they transiently contact the vesicle cluster. In such cases, the secretory vesicles could be transferred directly from microtubules to the cluster. In other cases, secretory vesicles presumably fall off of the microtubule as the + end disassembles, and they are transported to the vesicle cluster by myosin molecules (not shown) on actin cables. Vesicles fuse with the plasma membrane, releasing their contents and the components of the membranes of the secretory vesicles (here represented by SYNA) become incorporated into the plasma membrane. As the tip grows, the ring of actin/ABPA endocytic patches moves forward, removing SYNA and other vesicle membrane

components from the plasma membrane and incorporating them into endocytic vesicles for recycling. Although we do not have direct evidence, information from other systems and from Peñalva, Rodríguez and Arenza (personal communication) indicates that these vesicles move to the post-Golgi sorting endosome by mechanisms that are not yet defined. From this compartment, SYNA-containing membranes move away from the tip on microtubules, powered by dynein, to be eventually incorporated into Golgi-derived secretory vesicles containing cell wall biosynthetic enzymes and wall precursors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Elizabeth Oakley for technical assistance and for proofreading the manuscript. This work was supported by a Deutsche Forschungsgemeinschaft fellowship to N.T.-T., Grant-in-Aid for Scientific Research 17570162 from Japan Society for the Promotion of Science (to T.H.), Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica grants BIO2006-556 (to M.A.P.) and BFU2006-4185 (to E.A.E.), and National Institutes of Health grants GM-042564 (to S.A.O.) and GM-031837 (to B.R.O.). L.A.-B. is predoctoral fellow of the "Programa Nacional de Formación del Personal Investigador."

REFERENCES

- Aalto, M. K., Ronne, H., and Keranen, S. (1993). Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J.* 12, 4095–4104.
- Ali, M. Y., Krementsova, E. B., Kennedy, G. G., Mahaffy, R., Pollard, T. D., Trybus, K. M., and Warshaw, D. M. (2007). Myosin Va maneuvers through actin intersections and diffuses along microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 4332–4336.
- Araujo-Bazán, L., Peñalva, M. A., and Espeso, E. A. (2008). Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 67, 891–905.
- Bartnicki-Garcia, S. (1990). Role of vesicles in apical growth and a new mathematical model of hyphal morphogenesis. In: *Tip Growth in Plant and Fungal Cells*, ed. I. B. Heath, San Diego, CA: Academic Press, 211–232.
- Bartnicki-Garcia, S., Hergert, F., and Gierz, G. (1989). Computer simulation of fungal morphogenesis and the mathematical basis for hyphal (tip) growth. *Protoplasma* 153, 46–57.
- Bhatnagar, D., Yu, J., and Ehrlich, K. C. (2002). Toxins of filamentous fungi. *Chem. Immunol.* 81, 167–206.

- Brookman, J. L., and Denning, D. W. (2000). Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 468–474.
- Cheng, J., Park, T. S., Fischl, A. S., and Ye, X. S. (2001). Cell cycle progression and cell polarity require sphingolipid biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.* 21, 6198–6209.
- Cove, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 113, 51–56.
- David, D., Sundarababu, S., and Gerst, J. E. (1998). Involvement of long chain fatty acid elongation in the trafficking of secretory vesicles in yeast. *J. Cell Biol.* 143, 1167–1182.
- Engqvist-Goldstein, A. E., and Drubin, D. G. (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 287–332.
- Fidel, S., Doonan, J. H., and Morris, N. R. (1988). *Aspergillus nidulans* contains a single actin gene which has unique intron locations and encodes a gamma-actin. *Gene* 70, 283–293.
- Finger, F. P., Hughes, T. E., and Novick, P. (1998). Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* 92, 559–571.
- Fischer-Parton, S., Parton, R. M., Hickey, P. C., Dijksterhuis, J., Atkinson, H. A., and Read, N. D. (2000). Confocal microscopy of FM4-64 as a tool for analysing endocytosis and vesicle trafficking in living fungal hyphae. *J. Microsc.* 198, 246–259.
- Gerst, J. E. (1997). Conserved alpha-helical segments on yeast homologs of the synaptobrevin/VAMP family of v-SNAREs mediate exocytic function. *J. Biol. Chem.* 272, 16591–16598.
- Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. (2001). A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. *J. Theor. Biol.* 208, 151–164.
- Han, Gongshe, Liu, Bo, Zhang, Jun, Zuo, Wenqi, N., Morris, Ronald, and Xiang, X. (2001). The *Aspergillus* cytoplasmic dynein heavy chain and NUDF localize to microtubule ends and affect microtubule dynamics. *Curr. Biol.* 11, 719–724.
- Harris, S. D., Hamer, L., Sharpless, K. E., and Hamer, J. E. (1997). The *Aspergillus nidulans* sepA gene encodes an FH1/2 protein involved in cytokinesis and the maintenance of cellular polarity. *EMBO J.* 16, 3474–3483.
- Harris, S. D., Morrell, J. L., and Hamer, J. E. (1994). Identification and characterization of *Aspergillus nidulans* mutants defective in cytokinesis. *Genetics* 136, 517–532.
- Harris, S. D., Read, N. D., Roberson, R. W., Shaw, B., Seiler, S., Plamann, M., and Momany, M. (2005). Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot. Cell* 4, 225–229.
- Hohmann-Marriott, M. F., Uchida, M., van de Meene, A. M., Garret, M., Hjelm, B. E., Kokoori, S., and Roberson, R. W. (2006). Application of electron tomography to fungal ultrastructure studies. *New Phytol.* 172, 208–220.
- Horio, T., and Oakley, B. R. (2005). The role of microtubules in rapid hyphal tip growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 918–926.
- Huckaba, T. M., Gay, A. C., Pantalena, L. F., Yang, H. C., and Pon, L. A. (2004). Live cell imaging of the assembly, disassembly, and actin cable-dependent movement of endosomes and actin patches in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 167, 519–530.
- Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D. G. (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* 115, 475–487.
- Kaksonen, M., Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2005). A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell* 123, 305–320.
- Konzack, S., Rischitor, P. E., Enke, C., and Fischer, R. (2005). The role of the kinesin motor KipA in microtubule organization and polarized growth of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 497–506.
- Latge, J. P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol.* 9, 382–389.
- Lehman, R. (1995). Cell-cell signaling, microtubules, and the loss of symmetry in the *Drosophila* oocyte. *Cell* 83, 353–356.
- Lenz, J. H., Schuchardt, I., Straube, A., and Steinberg, G. (2006). A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *EMBO J.* 25, 2275–2286.
- Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H., and Pelham, H. R. (2000). Specific retrieval of the exocytic SNARE Snclp from early yeast endosomes. *Mol. Biol. Cell* 11, 23–38.
- Li, S., Du, L., Yuen, G., and Harris, S. D. (2006). Distinct ceramide synthases regulate polarized growth in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 17, 1218–1227.
- McGoldrick, C. A., Gruver, C., and May, G. S. (1995). *myoA* of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *J. Cell Biol.* 128, 577–587.
- Momany, M. (2002). Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 580–585.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A., and Oakley, B. R. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* 172, 1557–1566.
- Oakley, B. R., and Morris, N. R. (1981). A β -tubulin mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks microtubule function without blocking assembly. *Cell* 24, 837–845.
- Oakley, C. E., Weil, C. F., Kretz, P. L., and Oakley, R. B. (1987). Cloning of the *riboB* locus of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 53, 293–298.
- Osmani, A. H., Oakley, B. R., and Osmani, S. A. (2006). Identification and analysis of essential *Aspergillus nidulans* genes using the heterokaryon rescue technique. *Nat. Protoc.* 1, 2517–2526.
- Pearson, C. L., Xu, K., Sharpless, K. E., and Harris, S. D. (2004). MesA, a novel fungal protein required for the stabilization of polarity axes in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 15, 3658–3672.
- Pelham, H. R. (1999). SNAREs and the secretory pathway—lessons from yeast. *Exp. Cell Res.* 247, 1–8.
- Penalva, M. A. (2005). Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4–64. *Fungal Genet. Biol.* 42, 963–975.
- Protopopov, V., Govindan, B., Novick, P., and Gerst, J. E. (1993). Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* 74, 855–861.
- Read, N. D., and Kalkman, E. R. (2003). Does endocytosis occur in fungal hyphae? *Fungal Genet. Biol.* 39, 199–203.
- Riquelme, M., Bartnicki-Garcia, S., Gonzalez-Prieto, J. M., Sanchez-Leon, E., Verdin-Ramos, J. A., Beltran-Aguilar, A., and Freitag, M. (2007). Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 6, 1853–1864.
- Riquelme, M., Gierz, G., and Bartnicki-Garcia, S. (2000). Dynein and dynactin deficiencies affect the formation and function of the Spitzenkörper and distort hyphal morphogenesis of *Neurospora crassa*. *Microbiology* 146, 1743–1752.
- Riquelme, M., Fischer, R., and Bartnicki-Garcia, S. (2003). Apical growth and mitosis are independent processes in *Aspergillus nidulans*. *Protoplasma* 222, 211–215.
- Sharpless, K. E., and Harris, S. D. (2002). Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol. Biol. Cell* 13, 469–479.
- Smith, M. G., Swamy, S. R., and Pon, L. A. (2001). The life cycle of actin patches in mating yeast. *J. Cell Sci.* 114, 1505–1513.
- Steinberg, G. (2007a). On the move: endosomes in fungal growth and pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 309–316.
- Steinberg, G. (2007b). Hyphal growth: a tale of motors, lipids and the Spitzenkörper. *Eukaryot. Cell* 6, 351–360.
- Sun, Y., Martin, A. C., and Drubin, D. G. (2006). Endocytic internalization in budding yeast requires coordinated actin nucleation and myosin motor activity. *Dev. Cell* 11, 33–46.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A., and Oakley, B. R. (2006). Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nat. Protoc.* 1, 3111–3120.
- Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A. M., and Laborda, F. (1998). Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 144, 45–53.
- Ungar, D., and Hughson, F. M. (2003). SNARE protein structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 493–517.
- Valdez-Taubas, J., and Pelham, H. R. (2003). Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr. Biol.* 13, 1636–1640.
- Wedlich-Soldner, R., Bolker, M., Kahmann, R., and Steinberg, G. (2000). A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 19, 1974–1986.
- Yamashita, R. A., and May, G. S. (1998). Constitutive activation of endocytosis by mutation of *myoA*, the myosin I gene of *Aspergillus nidulans*. *J. Biol. Chem.* 273, 14644–14648.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C. P., Dou, X., Perez-Balaguer, A., and Osmani, S. A. (2004). Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot. Cell* 3, 1359–1362.



Two zinc finger transcription factors, CrzA and SlmA, are involved in cation homoeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*

Anja SPIELVOGEL^{*†}, Helen FINDON[‡], Herbert N. ARST, JR[‡], Lidia ARAÚJO-BAZÁN[†], Patricia HERNÁNDEZ-ORTÍZ[†], Ulf STAHL^{*}, Vera MEYER^{*} and Eduardo A. ESPESO^{†1}

^{*}Department of Microbiology and Genetics, Institute of Biotechnology, Berlin University of Technology, Gustav-Meyer-Allee 25, D-13355 Berlin, Germany, [†]CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Centro Investigaciones Biológicas, Department of Molecular Microbiology, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain, and [‡]Department of Microbiology, Imperial College London, Flowers Building, Armstrong Road, London SW7 2AZ, U.K.

To investigate cation adaptation and homoeostasis in *Aspergillus nidulans*, two transcription-factor-encoding genes have been characterized. The *A. nidulans* orthologue *crzA* of the *Saccharomyces cerevisiae* *CRZ1* gene, encoding a transcription factor mediating gene regulation by Ca^{2+} , has been identified and deleted. The *crzA* deletion phenotype includes extreme sensitivity to alkaline pH, Ca^{2+} toxicity and aberrant morphology connected with alterations of cell-wall-related phenotypes such as reduced expression of a chitin synthase gene, *chsB*. A fully functional C-terminally GFP (green fluorescent protein)-tagged form of the CrzA protein is apparently excluded from nuclei in the absence of added Ca^{2+} , but rapidly accumulates in nuclei upon exposure to Ca^{2+} . In addition, the previously identified *sltA* gene, which has no identifiable homologues in yeasts, was deleted, and the resulting

phenotype includes considerably enhanced toxicity by a number of cations other than Ca^{2+} and also by alkaline pH. Reduced expression of a homologue of the *S. cerevisiae* P-type ATPase Na^+ pump gene *ENA1* might partly explain the cation sensitivity of *sltA*-null strains. Up-regulation of the homologue of the *S. cerevisiae* vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchanger gene *VCX1* might explain the lack of Ca^{2+} toxicity to null-*sltA* mutants, whereas down-regulation of this gene might be responsible for Ca^{2+} toxicity to *crzA*-null mutants. Both *crzA* and *sltA* encode DNA-binding proteins, and the latter exerts both positive and negative gene regulation.

Key words: *Aspergillus nidulans*, calcium signalling, cation homoeostasis, cell-wall integrity, nuclear localization, transcription factor.

INTRODUCTION

Rapid adaptation to different environmental conditions, including appropriate adaptive responses to various cations, is crucial for the survival and proliferation of micro-organisms. The Ca^{2+} /calcineurin/Crz1p signalling pathway is necessary for adaptation to diverse environmental conditions, including high cation levels and alkaline pH, and considerable characterization of it has been performed in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspora delbrueckii* and *Candida albicans* [1–4]. Sudden exposure of *S. cerevisiae* to these stress conditions induces a transient increase in cytosolic Ca^{2+} levels, which triggers activation of the phosphatase calcineurin through binding of the Ca^{2+} -binding protein, calmodulin. *S. cerevisiae* calcineurin, like that of mammals, is composed of both catalytic and regulatory subunits [5]. Activated calcineurin mediates the dephosphorylation of the cytoplasmically localized transcription factor Crz1p, resulting in its translocation to the nucleus [6] (reviewed in [3]).

The nuclear-localized zinc finger Crz1p transcription factor then activates the expression of genes whose promoters contain physiologically relevant CDREs (calcineurin-dependent response elements) [7] 5'-GNGGC(G/T)CA-3', and up-regulates the expression of various target genes, including some which encode cation transporters that act at the plasma membrane or other membranous organelles [8–10]. We previously found that alkaline-pH-induced up-regulation of the *Aspergillus giganteus* *aff* (antifungal protein) gene can be prevented by FK506, an inhibitor of calcineurin [11]. To pursue *aff* regulation in the context of cation adaptation and homoeostasis, we have chosen to

investigate Ca^{2+} -mediated signalling in *Aspergillus nidulans*, an experimentally more amenable species than *A. giganteus*.

Ca^{2+} -mediated signalling has been less investigated in filamentous fungi than in yeasts, although some notable work was performed on calcineurin [12], which has been revisited recently [13]. It was initially reported that the *A. nidulans* gene encoding the calcineurin catalytic subunit is essential and required for cell-cycle progression [14,15]. Very recently, however, an *A. nidulans* ΔcnaA mutant strain, which had the calcineurin catalytic subunit deleted, was found to be viable and to display a phenotype similar to that observed for the corresponding *Aspergillus fumigatus* (ΔcalA) mutant strain, which has severe defects in growth extension, branching and conidiophore development [13]. In addition to displaying abnormal morphogenesis, the *A. fumigatus* ΔcalA mutant is also impaired in its virulence [16,17]. In *Aspergillus oryzae*, calcineurin is required for its adaptation to elevated temperature, high Na^+ levels and alkalization [18]. Crz1p orthologues have been recently characterized in the filamentous fungi *A. fumigatus* and *Botrytis cinerea*, where they play major roles in tolerance of certain cations [13,19].

Another transcription factor important for cation adaptation and homoeostasis is SlmA. An *A. nidulans* mutation, *sltA1*, resulting in toxicity by high levels of Na^+ and K^+ , was described previously [20]. Subsequently, cloning of the *sltA* gene by complementation of the *sltA1* mutation showed that it encodes a protein containing three Cys_2His_2 -type zinc fingers and exhibits significant similarity to the Ace1 transcriptional repressor of the cellulase and xylanase genes in *Hypocrea jecorinia* (*Trichoderma reesei*) [21]. Although O'Neil et al. [21] showed that the *sltA1* mutation results from a premature stop codon just downstream of the third zinc finger of

Abbreviations used: AFP, antifungal protein; CDRE, calcineurin-dependent response element; GFP, green fluorescent protein; GST, glutathione transferase; ORF, open reading frame; RT-PCR, reverse transcription-PCR; UTR, untranslated region; WMM, watch minimal medium.

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail eespeso@cib.csic.es).

Table 1 *A. nidulans* strains used in the present study

Strain	Genotype	Source/reference
J734	<i>biA1</i>	Dr J. Tilburn, Department of Microbiology, Imperial College London, London, U.K.
MAD1425	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnkuA::argB</i>	[25]
MAD1427	<i>pyrG89, pabaA1, riboB2, argB2, ΔnkuA::argB</i>	[25]
MAD1732	<i>pyroA4, pyrG89, inoB2, wA4, ΔnkuA::BAR, Myc3 × PacC(5–678)</i>	Dr E. A. Espeso, Centro Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain
MAD2055	<i>pyroA4, pyrG89, inoB2, wA4, ΔnkuA::BAR, Myc3 × PacC(5–678), crzA::gfp/Ai pyrG</i>	Dr E. A. Espeso, Centro Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain
BER02	<i>pyroA4, pyrG89, argB2, ΔnkuA::argB, ΔcrzA::pyr-4</i>	The present study
HHF17a	<i>pabaA1, yA2, argB2::argB+afp::lacZ</i>	The present study
HHF17d	<i>pabaA1, yA2, argB2::argB+afp::lacZ, ΔcrzA::pyr-4, pantoB100</i>	The present study
HHF17e	<i>pabaA1, yA2, argB2::argB+afp::lacZ, ΔsltA::Af riboB, pantoB100</i>	The present study
HHF17f	<i>argB2::argB+afp::lacZ, ΔsltA::Af riboB, ΔcrzA::pyr-4, pantoB100</i>	The present study

the predicted protein, they did not investigate the role of the SltA protein in cation tolerance, nor did they determine whether *sltA1* has a null phenotype.

In the present paper, we have characterized aspects of the role of the *A. nidulans* transcription factors CrzA, a homologue of *S. cerevisiae* Crz1p, and SltA, which has no identifiable *S. cerevisiae* homologue, but, like CrzA, is involved in cation adaptation and homeostasis. We show that both CrzA and SltA are capable of binding DNA and that SltA acts positively on transcription of the *Ena1p*-like Na⁺ pump gene *enaA* and negatively on transcription of the putative vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger gene *vcxA*. The negative regulation of *vcxA* by SltA is opposed by its transcriptional activation by CrzA, and the positive regulation by CrzA is the over-riding factor, as *vcxA* mRNA levels in a mutant lacking both of the transcription factors are indistinguishable from those in a mutant lacking only CrzA. Exposure to Ca²⁺ results in nuclear localization of CrzA.

EXPERIMENTAL

Strains, growth conditions, molecular techniques and phenotype analysis

A. nidulans strains used are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains DH5α (GibcoBRL) and XL10-Gold® (Stratagene) were used as hosts for the maintenance of the plasmids listed in Supplementary Table S1 (at <http://www.BiochemJ.org/bj/414/bj4140419add.htm>). General cloning procedures for *E. coli* were followed. Standard growth medium for *A. nidulans*, genetic techniques and phenotype testing were as described previously ([22] and references therein). The gene symbols used were described previously [23]. Reversion alleles of *sltA1* were selected in a UV-mutagenized strain of genotype *halA24 inoB2 sltA1* by their ability to enable growth on appropriately supplemented complete medium containing 1 M NaH₂PO₄ (final concentration) and their phenotypes were determined in a selection of outcrossed strains. *A. nidulans* transformation was performed as described previously ([22] and references therein). *A. nidulans* total RNA and genomic DNA preparation, as well as Northern blot and Southern blot analyses, were performed following standard protocols ([22] and references therein).

Identification of the *crzA* gene

The CrzA homologue in the *A. nidulans* genome was identified by Blastp searches using the *S. cerevisiae* Crz1p sequence. On the basis of sequence conservation and apparently similar function, AN5726 was named *crzA*. The position of the predicted intron within the *crzA* gene was verified by RT-PCR (reverse transcription-PCR) and is in agreement with GenBank entry

AB259568. Strain J734 was grown in liquid minimal medium and exposed for 2 h to 1 M NaCl, after which total RNA was obtained. Total RNA treated with 7.5 units of DNase I (FPLC pure, Amersham Biosciences) was used as the template for RT-PCR. First-strand synthesis was performed using primer CrzA-9 rev (see Supplementary Table S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/414/bj4140419add.htm>) and 200 units of ArrayScript™ Reverse Transcriptase (Ambion). The following PCR using primers CrzA-8 fw and CrzA-9 rev yielded full-length *crzA* cDNA, which was cloned into pGEM-T-Easy (Promega), resulting in pGEM-T-CrzAcDNA. The insert was subsequently sequenced using primer walking ([22] and references therein).

Deletion of *crzA*

The *crzA* deletion cassette was constructed as a gene-replacement cassette comprising the *pyr-4* gene of *Neurospora crassa* as the selection marker, flanked by 1.5 kb of 5'- and 3'-UTRs (untranslated regions) of the *crzA* gene. The 5'-UTR of *crzA* was amplified by PCR using genomic DNA from strain J734 and the primers crznulo-1 and crznulo-2, which introduced NotI and BamHI restriction sites respectively. The resulting PCR fragment was digested with NotI and BamHI and inserted into pBluescriptSK(+) (Stratagene), resulting in pBSKpromCrzA. The *pyr-4* selection marker, obtained from plasmid pFB6 [22] by BglII digestion, was inserted into BamHI-linearized pBSKpromCrzA to generate pBSKpromCrzApyr4-fw. The correct orientation of the *pyr-4* gene was verified by PCR and restriction analysis. The 3'-UTR of *crzA* was amplified by PCR using genomic DNA from strain J734 and the primers crznulo-3 and crznulo-4. The resulting PCR fragment was inserted into pGEM-T-Easy and excised using EcoRI digestion. The EcoRI fragment was inserted in the correct orientation into pBSKpromCrzApyr4-fw via the EcoRI restriction site. The final plasmid containing the 6.2 kb *crzA* deletion cassette was named pBSKdeltaCrzA. This cassette was amplified by PCR using primers crzAnulo1 and crzAnulo-4 and used to transform *A. nidulans* strain MAD1425. Pyrimidine prototrophic transformants were screened for the *crzA* deletion by Southern blot and PCR analysis, and strain BER02 was selected for further work.

Deletion of *sltA*

A cassette comprising the *A. fumigatus* *riboB* gene fused to the upstream and downstream UTRs of *sltA* was used to delete the *sltA* coding region. A 1.5 kb 5'-UTR of *sltA* was amplified using the primers sltnul1 and sltnul2, which included NotI and BamHI restriction sites respectively. The PCR fragment generated was digested with NotI and BamHI and cloned into the same restriction sites in pBluescriptSK(+) (Stratagene) to generate

pBS-SltA5'. A 1.5 kb 3'-UTR of *sltA* was amplified using the primers sln13 (inserting an EcoRI restriction site) and sln14 (containing a XhoI site). The PCR fragment was digested with EcoRI and XhoI and ligated into pBS-SltA5' to generate pBS-SltA5'3'. The EcoRI 1.9 kb fragment containing the *A. fumigatus* *riboB* coding region and 5'- and 3'-UTRs was obtained from p1548, and ligated into pBS-SltA5'3' digested with EcoRI to create pBSdeltaSltA. pBSdeltaSltA was digested with NotI and XhoI to yield the deletion cassette. The *sltA*-null strain was generated using MAD1427 as the recipient strain and selecting for transformants which were able to grow in the absence of riboflavin. Riboflavin prototrophs were analysed by Southern blotting, and one transformant carrying the desired insertion was used for further work.

GFP (green fluorescent protein)-tagging of *CrzA*

Construction of an *A. nidulans* strain expressing CrzA-GFP was performed following a method described previously [24], taking advantage of recently available strains which are deficient in heterologous recombination [25]. Amplification from 1.5 kb from the far 3'-end of the gene and the 3'-UTR region was performed using the primer pairs CrzA1/CrzA2 and CrzA3/CrzA4 respectively (see Supplementary Table S2) and fused in a three-way PCR with a fragment amplified with primers CrzA-GFP1 and CrzA-GFP2 which contained the *gfp* gene together with the selectable *pyrG* gene of *A. fumigatus* [24]. The fusion cassette was transformed into the MAD1732 strain following a protocol described previously [22] and references therein). Pyrimidine prototrophs were selected and homokaryotic transformants were analysed by Southern blotting for single-copy integration of the gene-replacement cassette.

Gene-expression analyses

Steady-state mRNA levels of the *A. nidulans* *ENA1*-like genes were detected using specific PCR-amplified genome probes. For AN6642, a probe of 1357 bp using primers An6642 rev and An6642 fw, covering 40 % of the ORF (open reading frame), was used. For AN1628, a probe of 948 bp using primers An1628 rev and An1628 fw, covering 29 % of the ORF, was used. For AN10982, a probe of 1295 bp using primers An10982 rev and An10982 fw, covering 37 % of the ORF, was used. To detect AN0471 (designated *vcxA*), a 926 bp fragment using primers An0471 rev and An0721 fw, covering 65 % of the ORF, was synthesized. For *chsB* detection (AN2523), a fragment of 719 bp was amplified using primers An2523 rev and An2523 fw, covering 30 % of the ORF. Actin transcript detection was used as the probe for the fifth exon, amplifying the genomic DNA with primers Anid-AcnA and Anid-AcnB. For details of oligonucleotide primer sequences see Supplementary Table S2.

Northern-blot analyses used total RNA extracted from wild-type and mutant strains grown in MMA (minimal medium agar) (pH 6.5) containing 1 % glucose and 10 mM ammonia as the main carbon and nitrogen sources respectively. To investigate the effects of various cations, the strains were incubated for 18 h at 37 °C, after which the addition of various substances and/or alterations to the pH were performed and incubated for a further time period as stated in the Figure legends.

Quantification of *enaA* and *acnA* transcription was performed by exposing the blots to a PhosphorImager screen (Molecular Dynamics) and developing using a FLA-5100 Reader (Fujifilm). Band intensities were measured using Multi-Gauge V3.0 software (Fujifilm).

Construction of GST (glutathione transferase)-CrzA and GST-SltA fusion proteins

The plasmid pGEX-CrzA123(469-603) was constructed to express a GST fusion protein containing the complete zinc-finger region of CrzA (amino acids 469-603). The zinc-finger region of *crzA* was amplified by PCR using genomic DNA from strain J734 as the template and the primers CrzA-ZF-fw-BamHI and CrzA-ZF-rev-EcoRI. Both oligonucleotide primers introduced the restriction sites for BamHI and EcoRI that allowed in-frame ligation of the PCR fragment into pGEX-2T (Amersham Biosciences) to generate pGEX-CrzA (469-603). The plasmid expressing the GST-SltA (amino acids 381-549) fusion protein was constructed by cloning a PCR amplicon obtained from J734 genomic DNA with the oligonucleotide primers SltA-ZF-fw-BamHI and SltA-ZF-rev-EcoRI (amplifying the entire zinc-finger region of the *sltA* gene and introducing BamHI and EcoRI restriction sites) into pGEX-2T to generate pGEX-SltA(381-549). Fidelity and the correct orientation of the inserts were verified by DNA sequencing. Fusion proteins were expressed in *E. coli* DH1 strain and purified by glutathione-affinity chromatography following the manufacturer's instructions (glutathione-Sepharose 4B resin; Amersham Biosciences).

EMSA (electrophoretic mobility-shift assay)

Synthetic double-stranded oligonucleotide primers were generated as described previously [26]. *A. giganteus* sites *afp*-CDRE-5 and *afp*-SLTA-1 were obtained by annealing the oligonucleotide primers CDRE-5 with CDRE-5(-) and SltA-1 with SltA-1(-) respectively. *T. reesei* probes 2C and 2C4 were obtained by annealing the oligonucleotide primers Ace1-2C-1 with Ace1-2C-2 and Ace1-2C4-1 with Ace1-2C4-2 respectively. For the *A. nidulans* *chsB* CDRE-1 site, oligonucleotide primers Chs-CDRE-1fw and Chs-CDRE-1rev were annealed (for oligonucleotide primer sequences see Supplementary Table 2).

Synthetic probes were labelled by end-filling using 2 units of Klenow polymerase (Roche) in the presence of a mixture containing dGTP (25 µM final concentration) and [α -³²P]dCTP (3000 Ci/mmol, PerkinElmer). Binding reactions were performed as described previously [26]. The binding reaction mixture (final volume of 20 µl) contained binding buffer [25 mM Hepes/KOH (pH 7.9), 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT (dithiothreitol) and 20 % (w/v) glycerol], 1 ng of labelled double-stranded oligonucleotide primers, 3 µg of non-specific competitor [poly(dI-dC) or poly(dA-dT) primers] and varying quantities of protein: GST, GST-CrzA (amino acids 469-603) or *E. coli* protein extracts for GST-SltA (amino acids 381-549). Various amounts of unlabelled double-stranded oligonucleotides as specific competitors (as indicated in the Figures or the Figure legends) were added to the reaction mixtures before the addition of protein. Reaction mixtures were kept on ice for 30 min, and DNA and DNA-protein complexes were separated by native PAGE (5 % gels). Gels were dried and analysed by autoradiography.

AFP susceptibility testing

Determination of the sensitivity of *A. nidulans* strains to AFP was performed following a method published previously [27].

Microscopy

Conidia of *A. nidulans* strains were grown in appropriately supplemented liquid minimal medium placed on to coverslips. Germlings adhering to the coverslips were observed using an Axioskop 50 microscope (Zeiss) equipped with a Camedia Digital Camera C-4000 Zoom (Olympus). Light images were captured with a ×40 objective lens. Images were processed using Adobe

Photoshop 6.0 (Adobe). Observations of *Aspergillus* fluorescent strains were performed in WMM (watch minimal medium) as described previously [28]. The *Aspergillus* strain expressing CrzA–GFP was cultured on the surface of glass-bottomed Petri dishes immersed in 2.5 ml of appropriately supplemented WMM at 25 °C for 16 h. The medium was replaced by fresh WMM supplemented with or without 10 mM CaCl₂, and the green fluorescence was observed using a Leica DMI6000b inverted microscope equipped with a GFP-specific filter (λ_{ex} , 470 nm and λ_{em} , 525 nm), and recorded with an Orca-ER camera (Hamamatsu) driven by the MetaMorph imaging system (Universal Imaging Corporation).

RESULTS

Identification of the *crzA* gene

The putative *A. nidulans* homologue of *S. cerevisiae* CRZ1, AN5726.3, denoted *crzA*, was identified by Blastp searches using the full-length Crz1p protein sequence. The *in silico* predicted cDNA sequence of *crzA* was verified by DNA sequencing of a RT–PCR product obtained from total RNA.

CrzA and Crz1p share 66% identity at the amino acid level within the putative DNA-binding domain, which comprises three zinc fingers, the first two of which conform to the Cys₂His₂ consensus sequence [(Y/F)XCX_{2–4}CX₃(Y/F)X₃LX₂HX_{3–4}H] (Figure 1A). This degree of sequence conservation suggests that CrzA and Crz1p might bind the same DNA target sequence. The third finger of Crz1p and its homologues, including CrzA, appear to have an atypical Cys₂HisCys structure with unusual spacing (Figure 1A) and is currently under study. The 730-amino-acid-residue CrzA protein, in common with its homologues, contains the DNA-binding domain in its C-terminal region. CrzA contains two overlapping putative CDDs (calcineurin-docking domains) (Figure 1B), whereas Crz1p, which is activated by dephosphorylation by calcineurin phosphatase, is thought to contain a single specific recognition sequence PXIXIT [29–31]. Putative Crz1p orthologues are widely distributed amongst the fungi, with sequence conservation notably high among filamentous fungi (Figure 1C and Supplementary Figure S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/414/bj414ppppadd.htm>). The *crzA* transcript appears to be expressed at a very low level by Northern blot analysis, but is increased somewhat by exposure to 100 mM CaCl₂ for periods of 5–30 min (results not shown). In contrast, no increase in *A. fumigatus* *crzA* transcript levels was reported in response to 10 or 60 min exposure to 200 mM CaCl₂ [13]. The very modest increase in *crzA* transcript levels in response to Ca²⁺ suggests that this regulation might be mainly post-transcriptional, particularly in view of the effect of Ca²⁺ on CrzA localization (see below).

The phenotype of a *crzA*-null mutation

To assess the physiological role of CrzA, a strain with *crzA* deleted was constructed by gene replacement using the *N. crassa* *pyr-4* gene as a selectable marker (see the Experimental section for details). The original transformant and outcrossed Δ *crzA* strains are, similarly to the corresponding deletion mutants of *A. fumigatus* and *B. cinerea* [13,19], strongly inhibited by elevated Ca²⁺ concentrations and alkaline pH (Figure 2), thus resembling the behaviour of *crz1* mutants [9,32], but to a more extreme extent.

Strains deleted for *crzA* show delayed germination in minimal medium in which Ca²⁺ is present only as a trace contaminant (Figure 3A). The presence of 100 mM CaCl₂ causes hyphal hyperbranching in Δ *crzA* strains (Figure 3B). Similar morphological abnormalities have been noted for the corresponding *A. fumigatus*

and *B. cinerea* deletion mutants [13,19]. Interestingly, Δ *crzA* strains show significant resistance to the toxicity of AFP (Figure 3C), which was recently shown to inhibit chitin biosynthesis, very probably as a result of inhibition of classes III and V chitin synthases [33]. In contrast, Δ *crzA* strains show slight hypersensitivities to other cell-wall perturbing compounds such as caspofungin and Congo Red (results not shown), further suggesting a role for CrzA in determining cell-wall structure. Cell-wall abnormalities have also been reported for the orthologous *B. cinerea* *crz1* deletion mutant [19]. The similarities in phenotype between null-*crzA* and null-*chsB* *A. nidulans* strains, which lack a class III chitin synthase [34,35], suggested that *chsB* might be under the transcriptional control of CrzA. Figure 3(D) shows that whereas transfer into medium containing 100 mM CaCl₂ elevates the transcript levels of *chsB* in a wild-type strain, it fails to do so in a Δ *crzA* strain, indicating that up-regulation of *chsB* in response to Ca²⁺ is CrzA-dependent. In agreement, the *chsB* promoter contains two putative CDRE sites (results not shown) conforming to the Crz1p-binding-site consensus sequence [7]. In contrast with the effect of Ca²⁺, 300 mM LiCl appears to have no effect on *chsB* transcript levels (Figure 3D).

Another target of CrzA regulation is AN0471.3, denoted *vcxA*^{AN0471}, which we identified as the closest *A. nidulans* homologue of *S. cerevisiae* VCX1 using tBlastn and Blastp searches. In *S. cerevisiae*, the vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger Vcx1p mediates the import of excess cytosolic Ca²⁺ into the vacuole [36]. VCX1 transcription is negatively regulated by calcineurin in a Crz1p-independent manner [8,37]. Figure 4(A) shows that *vcxA*^{AN0471} transcript levels are increased by 100 mM CaCl₂ in a CrzA-dependent manner. As a large number of Ca²⁺-regulated *S. cerevisiae* genes show a greater transcriptional response at an early time after alkalization, which provokes a transient rise in cytosolic Ca²⁺ levels than at a later time [6], *vcxA*^{AN0471} transcript levels were monitored at both 30 and 60 min following Ca²⁺ exposure. Indeed, steady-state transcript levels were lower at the later time point (Figure 4A). Expression of VCX1 homologues in *A. fumigatus* and *B. cinerea* is also dependent on the respective CRZ1 orthologues [13,19].

Subcellular localization of CrzA

To analyse the subcellular distribution of CrzA, a mutant *crzA* allele expressing C-terminally GFP-tagged CrzA was constructed by gene replacement using methods described previously [24,25,38]. The protein (CrzA–GFP) encoded by the tagged allele appears to be fully functional, as no Ca²⁺ sensitivity or growth impairment at an alkaline pH was observable (results not shown). In the absence of Ca²⁺ addition and any form of stress, CrzA–GFP is exclusively cytosolic, apparently excluded from nuclei (Figure 5). Upon addition of CaCl₂ (final concentration of 10 mM), CrzA rapidly accumulates in nuclei, eventually depleting the cytoplasm of fluorescence (Figure 5 and results not shown). Thus, as described previously for the CrzA orthologue Crz1p [6,31,39] (reviewed in [3]), CrzA appears to be subjected to active nuclear export and import machinery, with an increase in the cytosolic Ca²⁺ concentration eliciting its nuclear import (Figure 5). Presumably, as in *S. cerevisiae* [31], Ca²⁺ activation of calcineurin results in dephosphorylation of CrzA and a consequent loss of nuclear-export capability. *A. fumigatus* CrzA also localizes to the nucleus in response to Ca²⁺ [13], as does *B. cinerea* CRZ1 when expressed heterologously in *S. cerevisiae* [19].

Further characterization of *sltA* mutations

In view of the sensitivity of Δ *crzA* strains to Ca²⁺ toxicity, further characterization of mutations in the *sltA* gene where the *sltA1*

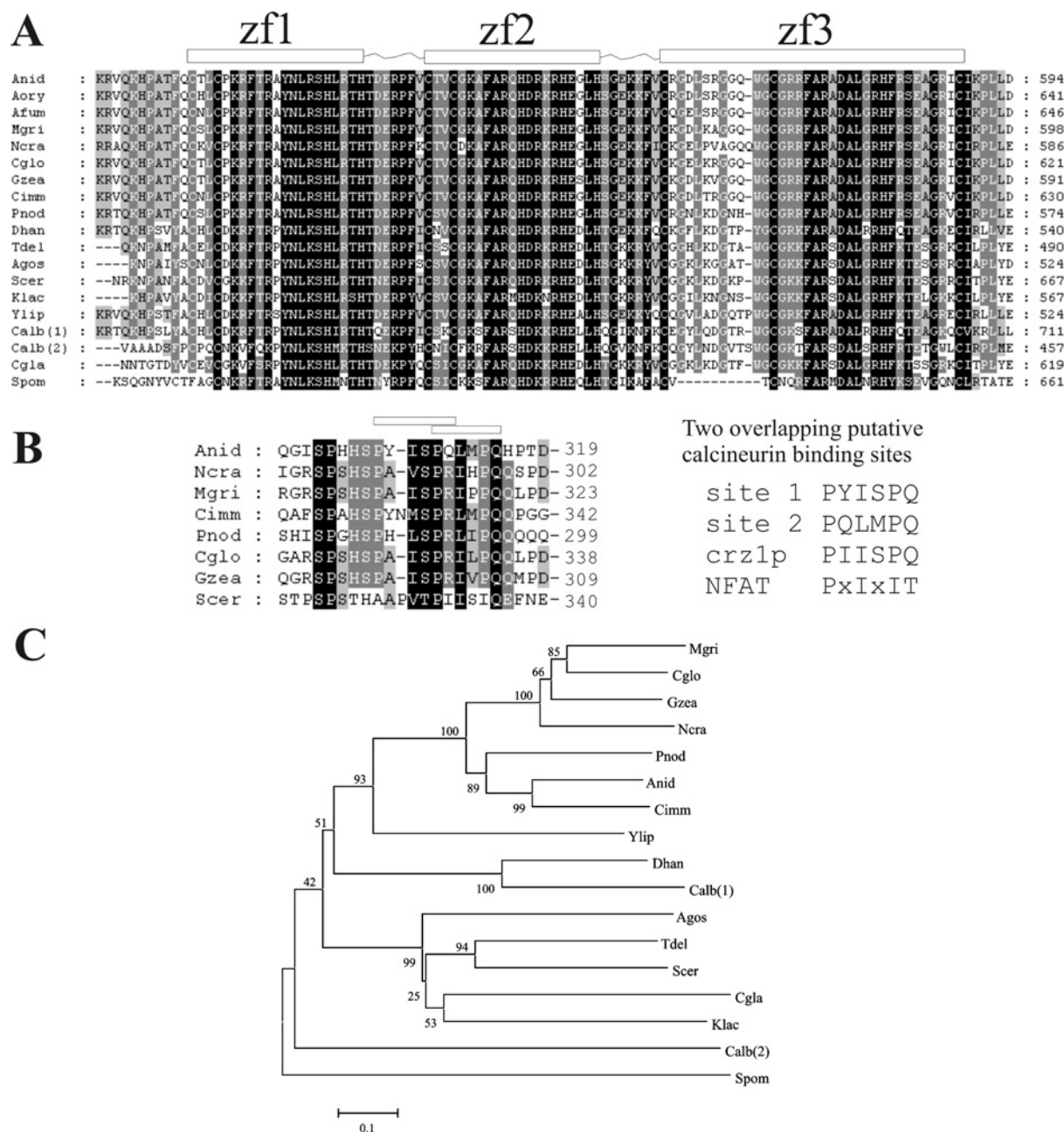


Figure 1 Sequence analysis of CrzA

(A) Multiple alignment of the zinc-finger domain of predicted CrzA homologues from yeast and filamentous fungi. The zinc-finger region is shown, with each Cys²His₂ zinc finger indicated by a white bar (zf). Two paralogues were identified in *C. albicans* [Calb(1) and (2)]. Protein alignments were performed using ClustalX [48]. (B) Alignment of a selected number of Crz homologues showing the putative CDD (calcineurin-docking domain). White rectangles above the alignment indicate the limits of the two putative CDDs in CrzA orthologues from filamentous fungi. The sequences of the two putative CDDs compared with the CDD present in Crz1p and the consensus sequence established from the CDDs present in NFAT (nuclear factor of activated T-cells) [29] are shown at the right-hand side. For both (A) and (B), residue shading follows BLOSUM32 similarities and the GenBank® Entrez Protein accession numbers are stated as follows: Anid, *A. nidulans* BAE94327; Aory, *A. oryzae* BAE57003; Afum, *A. fumigatus* EAL88401; Mgri, *Magnaporthe grisea* XP_359644; Ncra, *N. crassa* EAA32849; Cglo, *Chaetomium globosum* EAQ88414; Gzea, *Gibberella zeae* XP_381517; Cimm, *Coccidioides immitis* EAS33001; Pnod, *Phaeosphaeria nodorum* EAT87393; Dhan, *Debaryomyces hansenii* CAG84727; Tdel, *Torulaspora delbrueckii* AAZ04388; Agos, *Ashbya gossypii* AAS51722; Scer, *S. cerevisiae* CAA95889; Klac, *Kluyveromyces lactis* CAG99429; Ylip, *Yarrowia lipolytica* CAG80473; Calb(1), *C. albicans* EAK97605; Calb(2), *C. albicans* EAK93473; Cgla, *Candida glabrata* CAG62620; Spom, *Schizosaccharomyces pombe* Q09838. (C) Phylogenetic tree obtained from the full alignment of the Crz1p/CrzA homologues. The phylogenetic tree was built using MEGA 3.0 [49]. The bootstrap value obtained after 10 000 replicates is shown on the top of each branch. The scale bar indicates relative evolutionary distance.

allele confers sensitivity to the Na⁺ and K⁺ cations [20,21,40] seemed warranted. Although SltA homologues are widely distributed in filamentous fungi, we have been unable to detect any in searches of yeast genomes. The *sltA* gene encodes a 698-amino-acid-residue protein containing three Cys²His₂ zinc fingers, and the *sltA1* mutation changes Trp⁵⁰², the second codon following

that of the last histidine residue of finger 3, to a stop codon (see Supplementary Figure S2A at <http://www.BiochemJ.org/bj/414/bj414ppppadd.htm>) [21].

To determine the phenotype of a null-*sltA* allele and to see whether *sltA1* has a null phenotype, a deletion allele was constructed by gene replacement using the *A. fumigatus*

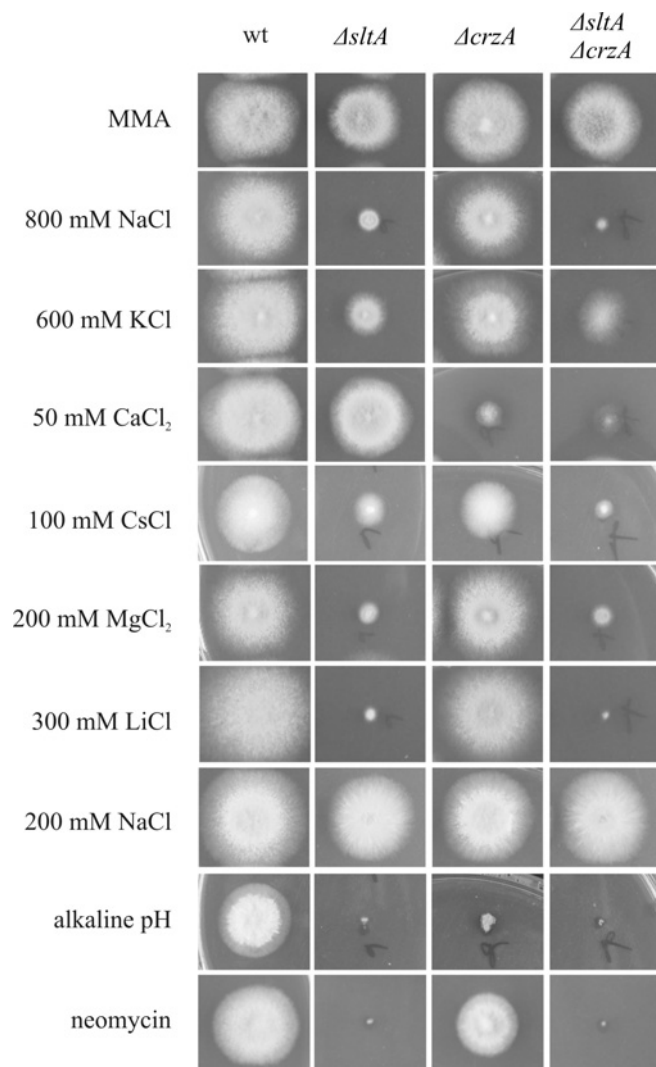


Figure 2 Phenotypic analysis of *A. nidulans* strains defective for CrzA and/or SltA function

Spores were point-inoculated on to agar plates containing MMA [minimal medium agar (pH 6.5) with 1% glucose as a carbon source] supplemented with different salts, as indicated, or neomycin (625 ng/ml). The alkaline pH plate (pH ~8) contained 100 mM Na_2HPO_4 , with the plate supplemented with 200 mM NaCl used as a Na^+ control for the alkaline pH medium. Plates were incubated for 2 days at 37 °C. ΔcrzA , strain HH17d; ΔsltA , strain HH17e; $\Delta\text{crzA}\Delta\text{sltA}$, strain HH17f; wt, wild-type, strain HHF17a.

ribB gene as a selectable maker (see the Experimental section and Supplementary Figure S2B for details). We detected no phenotypic differences between ΔsltA and sltA1 , suggesting that at least some portion of the C-terminal 197 amino acid residues is essential to SltA function (results not shown). As shown in Figure 2, the absence of functional SltA results in an elevated sensitivity to Li^+ , Cs^+ and Mg^{2+} , in addition to Na^+ and K^+ , the inability to grow at alkaline pH, and hypersensitivity to neomycin toxicity. In plate tests, $\Delta\text{crzA}\Delta\text{sltA}$ double mutants have phenotypes which are the sum of the single mutant phenotypes (Figure 2).

Although overall conservation of the C-terminal sequence beyond the third zinc finger of SltA is low among putative homologues, Trp⁵⁰² and the residues immediately downstream from it are highly conserved, suggesting that this region might be required for full functionality (Supplementary Figure S2A). To test this possibility, revertants of a sltA1 strain were obtained,

Table 2 *sltA1* revertant alleles

For four of the mutations, allele numbers were not allocated as reversion was from TGA back to wild-type TTG at codon 502.

<i>sltA</i> Mutant allele	Change in protein	Change in codon 502
<i>sltA</i> 10, 14, 17 and 18	W502R	TGA to CGA
<i>sltA</i> 11, 12, 13 and 20	W502L	TGA to TTA
<i>sltA</i> 15	W502F	TGA to TTT
<i>sltA</i> 16	W502K	TGA to AAA
<i>sltA</i> 19	W502C	TGA to TGC

after UV mutagenesis, as those which allowed growth in the presence of 1 M NaH_2PO_4 . As well as reversion in codon 502 to the wild-type tryptophan codon, partially functional revertants encoding arginine, leucine, phenylalanine, lysine or cysteine at codon 502 were also obtained (Table 2). Unsurprisingly, reversion to a phenylalanine residue appears to result in the greatest degree of functionality. These reversion results indicate that Trp⁵⁰² is itself an important residue and that one or more additional important residues is/are located C-terminal to it.

SltA acts negatively in the control of *vcxA*^{AN0471} and positively in the control of *enaA*^{AN6642}

The ΔsltA mutant showed an elevated response in *vcxA*^{AN0471} transcript levels in the presence of Ca^{2+} at both 30 and 60 min, and the response is more pronounced at the latter time point (Figure 4B, and results not shown). However, ΔcrzA is epistatic to ΔsltA in controlling *vcxA*^{AN0471}, as with the $\Delta\text{crzA}\Delta\text{sltA}$ double mutant there is no response in *vcxA*^{AN0471} transcript levels (Figure 4B) in the presence of Ca^{2+} , which correlates with the fact that Ca^{2+} inhibition of the $\Delta\text{crzA}\Delta\text{sltA}$ double mutant is very similar to that of the ΔcrzA single mutant (Figure 2).

Using *S. cerevisiae* Ena1p, Ena2p and Ena5p in Blastp and tBlastn searches of the *A. nidulans* genome (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/aspergillus_group/Blast.html), three loci whose predicted protein products are closely related to the Ena P-type ATPase Na^+ pumps, AN6642.3 (designated *enaA* [41]), AN1628.3 and AN10982.3, were identified (results not shown). We have designated these genes *enaA*^{AN6642}, *enaB*^{AN1628} and *enaC*^{AN10982}. In *S. cerevisiae*, the Ena transporters are involved in the salt-stress response and are required for growth at alkaline pH [42,43].

Expression of *enaA*^{AN6642} requires a combination of elevated concentrations of Na^+ and alkaline pH (Figure 6). We have been unable to detect transcripts for *enaB*^{AN1628} and *enaC*^{AN10982} under these conditions or the genetic backgrounds shown in Figure 6. Neither 300 mM LiCl nor 100 mM CaCl_2 is sufficient to induce expression of any of the *ena* genes (results not shown). Figure 6 shows that SltA plays a significant positive-acting role in *enaA*^{AN6642} expression; however, if CrzA plays a role, it is much more marginal.

CrzA and SltA are both DNA-binding proteins

The putative DNA-binding domains, containing the entire zinc-finger regions, amino acid residues 469–603 for CrzA and amino acid residues 381–549 for SltA were expressed in *E. coli* as GST fusion proteins. Although purification of GST–CrzA (amino acids 469–603) using glutathione-affinity chromatography was feasible, we did not succeed in purifying GST–SltA (amino acids 381–549) despite trying several elution conditions (results not shown). Consequently, bacterial crude protein extracts were used in DNA-binding studies.

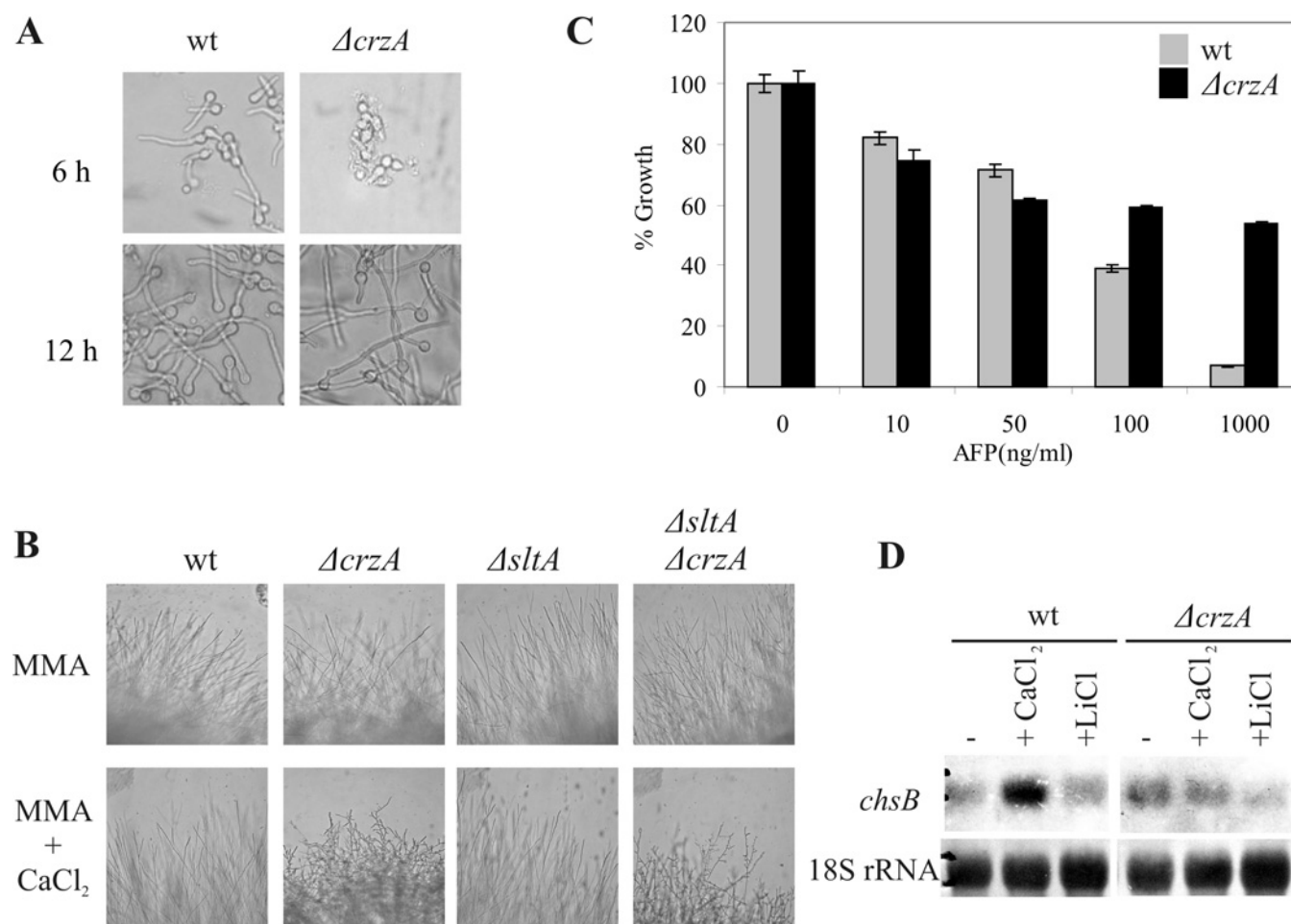


Figure 3 Effect of deletion of *crzA* on germination, morphology, AFP sensitivity and expression of the *chsB* chitin synthase gene

(A) Conidia from MAD1425 (wt) and BER02 ($\Delta crzA$) strains were grown on coverslips at 37°C for either 6 or 12 h. Images were captured with a $\times 63$ objective lens. (B) HFF17a (wt), HFF17d ($\Delta crzA$), HFF17e ($\Delta sltA$) and HFF17f ($\Delta crzA \Delta sltA$) strains were grown on MMA (minimal medium agar) plates in the absence or presence (MMA+CaCl₂) of 100 mM CaCl₂. Microscope photographs were taken of the colony edges ($\times 10$ magnification). (C) Conidia (1000) obtained from MAD1425 (wt) and BER02 ($\Delta crzA$) strains were cultivated at 28°C in 150 μ l of YPG [1% (w/v) yeast extract/2% (w/v) peptone/2% (w/v) glucose] complete medium in the presence of different AFP concentrations. After 48 h, the attenuation (D_{600}) at 600 nm was measured. Results are means \pm S.D. for triplicate experiments. (D) Transcript levels for *chsB* were determined in MAD1425 (wt) and BER02 ($\Delta crzA$) strains after treatment at 37°C for 60 min with 100 mM CaCl₂ or 300 mM LiCl. The untreated controls are indicated (–). Strains were cultivated in liquid MMA (pH 6.5) for 18 h at 37°C, after which 100 mM CaCl₂ or 300 mM LiCl (final concentration) was added. After an additional incubation for 60 min at 37°C, total RNA was isolated, blotted and hybridized with a *chsB* probe. Methylene Blue-stained 18 S rRNA served as a loading control.

To characterize the DNA-binding ability of GST–CrzA (amino acids 469–603), probes conforming to the *S. cerevisiae* Crz1p consensus-site CDRE [7] were synthesized (Figure 7A). Two putative CDRE sites were identified in the *A. nidulans chsB* promoter, and five such sites were identified in the *A. giganteus afp* promoter, previously suggested to be under the control of the Ca²⁺–calcineurin signalling pathway [11]. CrzA binds to CDRE-1 from the *chsB* promoter and to CDRE-5 from the *afp* promoter (Figures 7B and 7C), confirming that binding sequences for CrzA and Crz1p are very similar or identical.

Because of the sequence similarity of SltA to *T. reesei* ACE1 in the zinc-finger region [21], the ability of GST–SltA (amino acids 381–549) to bind to the 2C and mutant 2C4 probes described previously [44] was tested. Similarly to ACE1 binding, SltA binds to the 2C but not the 2C4 probe (Figure 7D). SltA also binds to the SLTA-1 site of the *afp* promoter, which conforms to the AGGCA ACE1 consensus site (Figures 7A, 7D and 7E).

As the trinucleotide GGC is common to sequences bound by CrzA and SltA, we tested whether either of the fusion proteins

might bind to a site bound by the other. However, we found no evidence for binding of SltA to *afp* CDRE-5 (Figure 7D) or of CrzA to *afp* SLTA-1 (Figure 7E).

DISCUSSION

The two putative transcription factors investigated here are both involved in preventing the toxicity of certain cations. In the absence of functional SltA, *A. nidulans* is abnormally sensitive to toxicity by Na⁺, K⁺, Li⁺, Cs⁺ and Mg²⁺, but not by Ca²⁺, whereas the absence of CrzA results in the toxicity of Ca²⁺. Transcript levels of the putative vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchanger gene *vcxA* in response to high Ca²⁺ levels provides a possible explanation for the Ca²⁺ toxicity to $\Delta crzA$ strains and the lack of Ca²⁺ toxicity in $\Delta sltA$ strains. Whereas $\Delta sltA$ strains show an elevated response to Ca²⁺ in *vcxA* transcript levels, putatively allowing greater vacuolar storage and thus detoxification of Ca²⁺, $\Delta crzA$ strains apparently show no Ca²⁺ response at all, putatively resulting in elevated

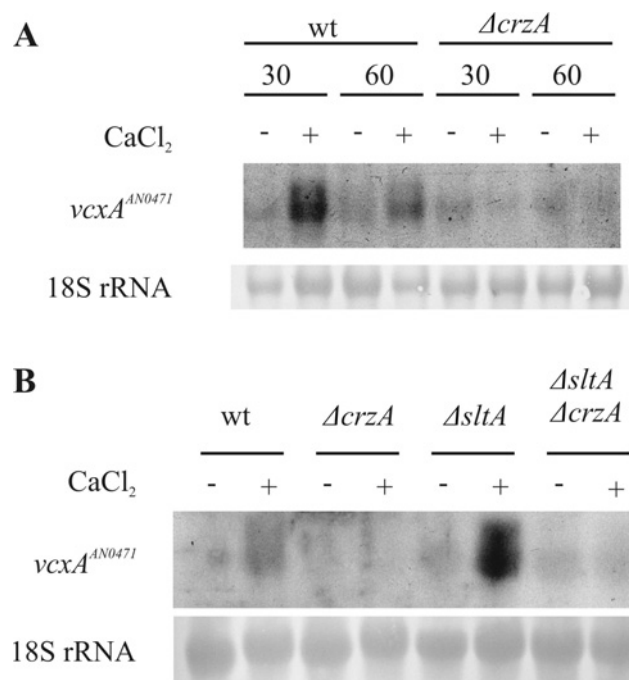


Figure 4 Effects of various genotypes and elevated Ca^{2+} levels on *vcxA* expression

(A) *vcxA* transcript levels were determined after 30 and 60 min in the presence (+) or absence (–) of 100 mM CaCl_2 in MAD1425 (wt) and BER02 (ΔcrzA) strains. Strains were cultivated in liquid MMA (minimal medium agar) (pH 6.5) for 18 h at 37°C , after which 100 mM CaCl_2 (final concentration) was added. After an additional incubation for either 30 or 60 min at 37°C , total RNA was isolated, blotted and hybridized with a *vcxA* probe. Methylene Blue-stained 18 S rRNA served as a loading control. (B) Expression of *vcxA* was determined at 30 (results not shown) and 60 min after CaCl_2 addition in HFF17a (wt), HFF17d (ΔcrzA), HFF17e (ΔsltA) and HFF17f ($\Delta\text{crzA} \Delta\text{sltA}$) strains. Strains were cultivated in liquid MMA (pH 6.5) for 18 h at 37°C , after which 100 mM CaCl_2 (final concentration) was added. After an additional incubation for either 30 or 60 min at 37°C , total RNA was isolated, blotted and hybridized with a *vcxA* probe. Methylene Blue-stained 18 S rRNA served as a loading control.

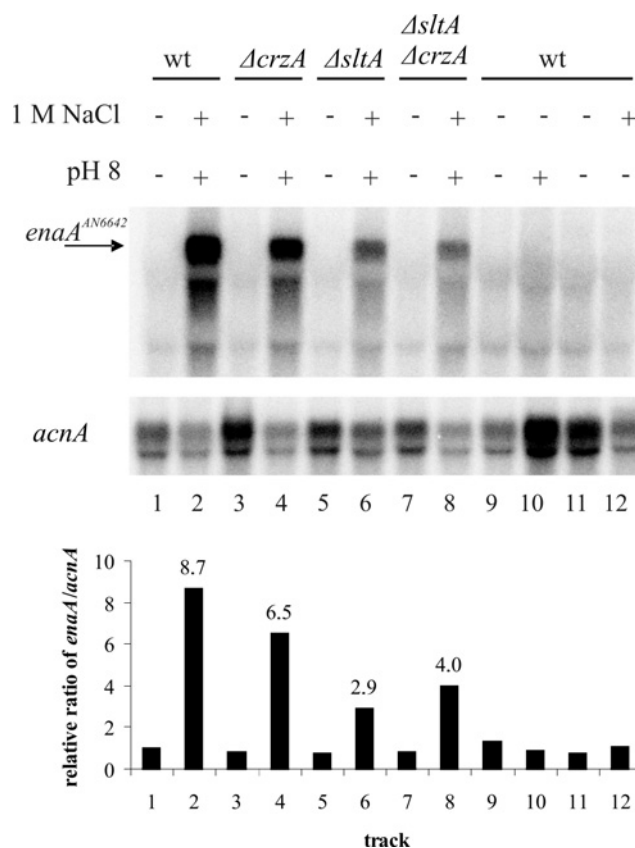


Figure 6 Effects of various treatments and genotypes on *enaA* expression

HFF17a (wt), HFF17d (ΔcrzA), HFF17e (ΔsltA) or HFF17f ($\Delta\text{crzA} \Delta\text{sltA}$) strains were cultivated in liquid MMA (minimal medium agar) (pH 6.5) for 18 h at 37°C , after which 1 M NaCl (final concentration) was added and/or the pH of the culture broth was adjusted to pH 8 (using NaOH). After an additional incubation at 37°C for 60 min, total RNA was isolated, blotted and hybridized with *enaA* and *acnA* (actin) probes. Lower panel: levels of *enaA* transcripts were determined and expressed relative to those of the actin mRNAs.

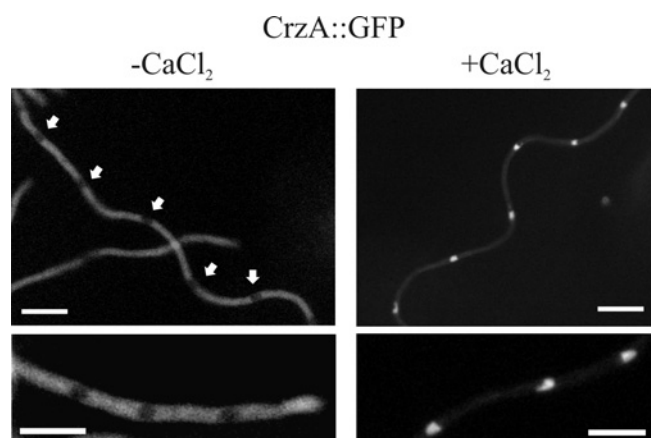


Figure 5 Subcellular distribution of CrzA

MAD2055, an *A. nidulans* strain expressing CrzA–GFP (CrzA::GFP), was grown in WMM for 18 h at 25°C in glass-bottomed Petri dishes for microscopy. Mycelia were transferred into fresh medium with (+) or without (–) 10 mM CaCl_2 and photographed after 10 min incubation at 25°C . Upper panels: nuclei devoid of fluorescence (arrows) are visible in cells growing in medium without added Ca^{2+} . In the presence of Ca^{2+} , the nuclei become strongly fluorescent. Lower panels: images showing in more detail the fluorescence distribution within the hyphae under both growth conditions. Scale bar, $5 \mu\text{m}$.

cytosolic Ca^{2+} levels. The VcxA homologue in *S. cerevisiae*, Vcx1p, mediates the vacuolar import of excess cytosolic Ca^{2+} [36]. One possible factor in cation toxicity in *sltA*-null strains is a reduction in the induction of the putative cation exporter EnaA^{AN6642}, as the homologous *S. cerevisiae* plasma-membrane exporter Ena1p enables a detoxification response to Na^+ , Li^+ and alkaline conditions [42,43].

The presence of three putative SltA/ACE1 binding sites 5' to the *enaA* coding region and one such site 5' to the *vcxA* coding region is consistent with SltA regulation of the transcription levels of these genes. Five putative CDRE sites lie upstream of the *vcxA* coding region, consistent with CrzA transcriptional regulation of *vcxA*. One CDRE site lies upstream of the *enaA* coding region, but, due to a lack of solid evidence that CrzA regulates *enaA*, its significance, if any, is unclear. Further work will be necessary in order to determine the physiological relevance of these 5' sites.

This work has highlighted significant differences between *A. nidulans* and *S. cerevisiae*. *S. cerevisiae* lacks an identifiable SltA homologue and, while *S. cerevisiae* Crz1p is not involved in *VCX1* expression, but plays a crucial role in *ENA1* expression [9], *A. nidulans* CrzA plays a crucial role in *vcxA* expression (similar to findings in *A. fumigatus* and *B. cinerea*), but is hardly involved, if at all, in *enaA*^{AN6642} regulation. The role of CrzA in Ca^{2+} -induced

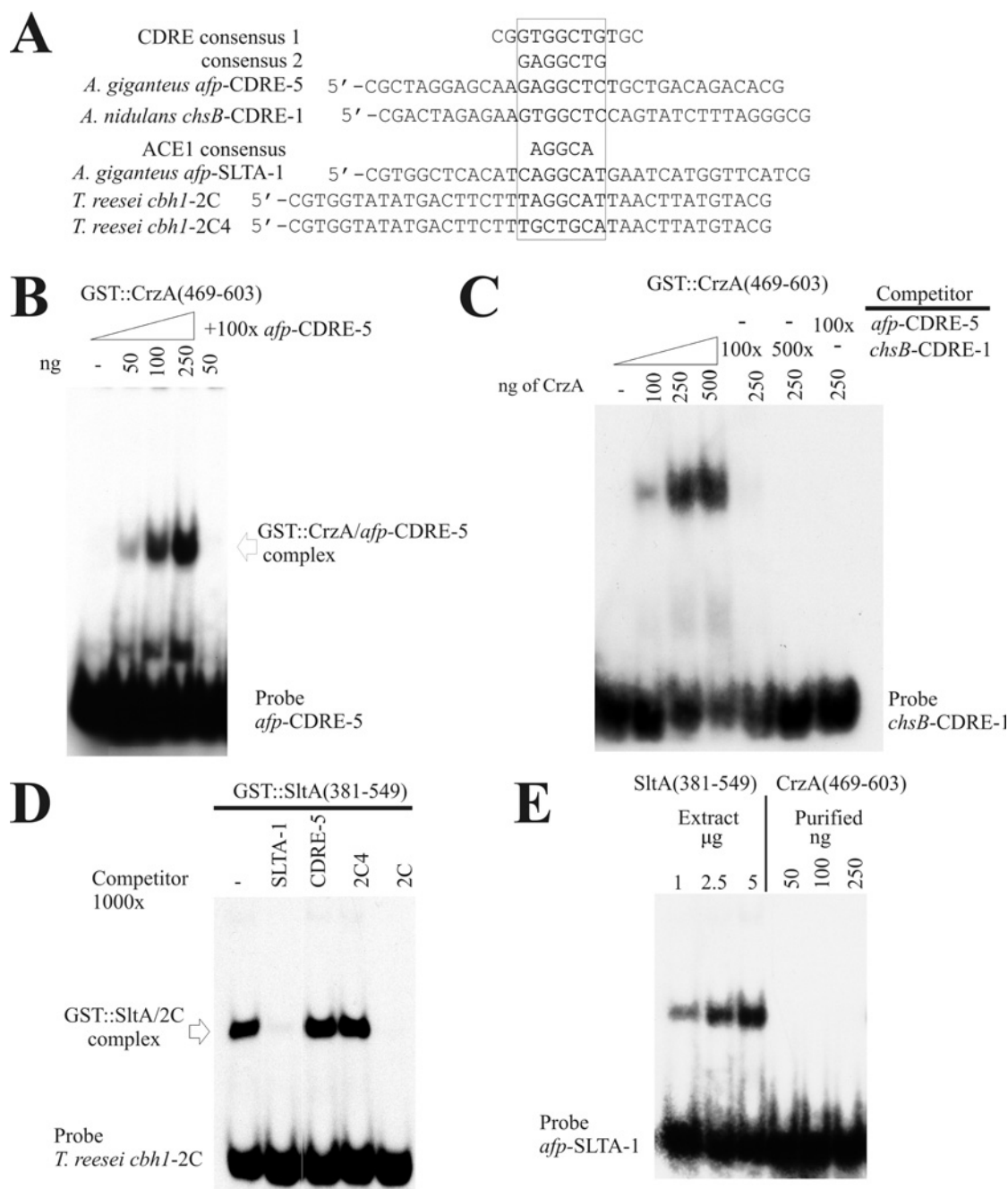


Figure 7 DNA-binding capabilities and specificities of CrzA and SltA

(A) Alignment of Crz1p/CrzA and ACE1/SltA DNA-binding sites. CDRE consensus sequences 1 and 2 correspond to those described in [10] and [7] respectively. The core sequences of these binding sites are indicated. Probes CDRE-5 and SLTA-1 are synthetic sites from the *AFP* promoter (*afp*) of *A. giganteus*. Probe 2C is one of the ACE1-binding sites found in the *T. reesei* *cbh1* promoter and 2C4 is a 2C mutant probe as described previously [44]. Probe CDRE-1 is a synthetic site from the *A. nidulans* *chsB* promoter. (B) EMSA (electrophoretic mobility-shift assay) of GST-CrzA (amino acids 469–603) [GST::CrzA(469–603)] binding to an *afp*-CDRE-5 probe. (C) EMSA of GST-CrzA (amino acids 469–603) [GST::CrzA(469–603)] binding to a CDRE present in the *chsB* promoter. Binding to this site is subject to competition by the same unlabelled probe or the *afp*-CDRE-5 probe. For both (B) and (C), the values at the top of the gel refer to the quantity of purified protein used in the assay (in ng). (D) EMSA of SltA binding to the 2C probe. *E. coli* extract (1.5 μ g) expressing GST-SltA (amino acids 381–549) [GST::SltA(381–549)] was used in each reaction. The affinity and specificity of binding are shown by competition with 1000 \times (300 ng) of unlabelled probes SLTA-1, CDRE-5, 2C and 2C4. (E) Specific recognition of *afp*-SLTA-1 probe by SltA. EMSA of SltA is shown using different amounts (μ g) of *E. coli* crude extract expressing GST-SltA (amino acids 381–549) [SltA(381–549)]. Purified GST-CrzA (amino acids 469–603) [CrzA(469–603)] does not bind to this probe.

chsB expression has drawn attention to a parallel situation in *C. albicans*, where Ca^{2+} stimulation of the promoter activity for four different chitinase genes is Crz1p-dependent [45].

A further point of interest is that SltA appears to play both a positive (in *enaA*^{AN6642} regulation) and a negative (in *vcxA*

regulation) role, with the caveat that we have not yet shown that SltA acts directly to regulate the genes in question. The PacC transcription factor, which mediates control of gene expression by ambient pH in *A. nidulans*, acts as both an activator and a repressor [46], but its *S. cerevisiae* homologue Rim101p exerts

positive regulation by repressing transcription of genes encoding other transcriptional repressors [47]. Finally, we note that at least three transcription factors are necessary for growth of *A. nidulans* at alkaline pH: PacC [46], and, as established here, SlrA and CrzA. In the case of SlrA, at least one pertinent factor is its role in *enaA*^{AN6642} expression.

We thank Barbara Walewska, Susanne Engelhardt, Tatiana Munera Huertas and Elena Reoyo for technical assistance, and Dr Berl Oakley (Department of Molecular Genetics, Ohio State University, Columbus, OH, U.S.A.) for plasmid p1548 containing the *A. fumigatus* *riboB* gene. We are grateful to the Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) for support through grant BB/D52178/1 to H.N.A., and to the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (D.G.I.C.Y.T.) for support through grant BFU2006-04185 to E.A.E.L.A.-B. is a pre-doctoral fellow of the PFPU of the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

REFERENCES

- Hirayama, S., Sugiura, R., Lu, Y., Maeda, T., Kawagishi, K., Yokoyama, M., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Shuntoh, H. and Kuno, T. (2003) Zinc finger protein Prz1 regulates Ca^{2+} but not Cl^- homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **278**, 18078–18084.
- Hernandez-Lopez, M. J., Panadero, J., Prieto, J. A. and Rande-Gil, F. (2006) Regulation of salt tolerance by *Torulaspora delbrueckii* calcineurin target Crz1p. *Eukaryotic Cell* **5**, 469–479.
- Cyert, M. S. (2003) Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 1143–1150.
- Karababa, M., Valentino, E., Pardini, G., Coste, A. T., Bille, J. and Sanglard, D. (2006) CRZ1, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **59**, 1429–1451.
- Cyert, M. S., Kunisawa, R., Kaim, D. and Thorner, J. (1991) Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7376–7380.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barcelo, A. and Arino, J. (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **279**, 43614–43624.
- Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A. P., Li, H. X., Ogawa, N., Botstein, D., Brown, P. O. and Cyert, M. S. (2002) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 31079–31088.
- Matheos, D. P., Kingsbury, T. J., Ahsan, U. S. and Cunningham, K. W. (1997) Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**, 3445–3458.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R. and Arino, J. (2002) The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol. Microbiol.* **46**, 1319–1333.
- Stathopoulos, A. M. and Cyert, M. S. (1997) Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* **11**, 3432–3444.
- Meyer, V., Spielvogel, A., Funk, L., Tilburn, J., Arst, Jr, H. N. and Stahl, U. (2005) Alkaline pH-induced up-regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein (AFP) of *Aspergillus giganteus* is not mediated by the transcription factor PacC: possible involvement of calcineurin. *Mol. Genet. Genomics* **274**, 295–306.
- Stie, J. and Fox, D. (2008) Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryotic Cell* **7**, 177–186.
- Soriani, F. M., Malavazi, I., Silva Ferreira, M. E., Savoldi, M., Zeska Kress, M. R., Souza Goldman, M. H., Loss, O., Bignelli, E. and Goldman, G. H. (2008) Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. *Mol. Microbiol.* **67**, 1274–1291.
- Nanthakumar, N. N., Dayton, J. S. and Means, A. R. (1996) Role of Ca^{++} /calmodulin binding proteins in *Aspergillus nidulans* cell cycle regulation. *Prog. Cell Cycle Res.* **2**, 217–228.
- Rasmussen, C., Garen, C., Brining, S., Kincaid, R. L., Means, R. L. and Means, A. R. (1994) The calmodulin-dependent protein phosphatase catalytic subunit (calcineurin A) is an essential gene in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **13**, 3917–3924.
- Silva Ferreira, M. E., Heinekamp, T., Hartl, A., Brakhage, A. A., Semighini, C. P., Harris, S. D., Savoldi, M., de Gouvea, P. F., Souza Goldman, M. H. and Goldman, G. H. (2007) Functional characterization of the *Aspergillus fumigatus* calcineurin. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 219–230.
- Steinbach, W. J., Cramer, Jr, R. A., Perfect, B. Z., Asfaw, Y. G., Sauer, T. C., Najvar, L. K., Kirkpatrick, W. R., Patterson, T. F., Benjamin, Jr, D. K., Heitman, J. and Perfect, J. R. (2006) Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* **5**, 1091–1103.
- Juvvadi, P. R., Kuroki, Y., Arioka, M., Nakajima, H. and Kitamoto, K. (2003) Functional analysis of the calcineurin-encoding gene *cnaA* from *Aspergillus oryzae*: evidence for its putative role in stress adaptation. *Arch. Microbiol.* **179**, 416–422.
- Schumacher, J., de Larrinoa, I. F. and Tudzynski, B. (2008) Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants. *Eukaryotic Cell* **7**, 584–601.
- Spathas, D. H. (1978) A salt sensitive mutation on chromosome VI of *Aspergillus nidulans*. *Aspergillus Newsletter* **46**, 28.
- O'Neil, J. D., Bugno, M., Stanley, M. S., Barham-Morris, J. B., Woodcock, N. A., Clement, D. J., Clipson, N. J. W., Whitehead, M. P., Fincham, D. A. and Hooley, P. (2002) Cloning of a novel gene encoding a C_2H_2 zinc finger protein that alleviates sensitivity to abiotic stresses in *Aspergillus nidulans*. *Mycol. Res.* **106**, 491–498.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M. A. and Arst, Jr, H. N. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**, 779–790.
- Clutterbuck, A. J. (1993) *Aspergillus nidulans*. In *Genetic Maps, Locus Maps of Complex Genomes* (O'Brien, S.J., ed.), pp. 3.71–73.84. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Yang, L., Ukil, L., Osmani, A., Nahm, F., Davies, J., De Souza, C. P., Dou, X., Perez-Balaguer, A. and Osmani, S. A. (2004) Rapid production of gene replacement constructs and generation of a green fluorescent protein-tagged centromeric marker in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell* **3**, 1359–1362.
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., Hynes, M. J., Osmani, S. A. and Oakley, B. R. (2006) A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**, 1557–1566.
- Orejas, M., Espeso, E. A., Tilburn, J., Sarkar, S., Arst, Jr, H. N. and Penalva, M. A. (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**, 1622–1632.
- Theis, T., Wedde, M., Meyer, V. and Stahl, U. (2003) The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 588–593.
- Penalva, M. A. (2005) Tracing the endocytic pathway of *Aspergillus nidulans* with FM4-F64. *Fungal Genet. Biol.* **42**, 963–975.
- Aramburu, J., Garcia-Cozar, F., Raghavan, A., Okamura, H., Rao, A. and Hogan, P. G. (1998) Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol. Cell* **1**, 627–637.
- Roy, J., Li, H., Hogan, P. G. and Cyert, M. S. (2007) A conserved docking site modulates substrate affinity for calcineurin, signaling output, and *in vivo* function. *Mol. Cell* **25**, 889–901.
- Boustany, L. M. and Cyert, M. S. (2002) Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev.* **16**, 608–619.
- Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J. M., Serrano, R. and de Larrinoa, I. F. (1998) Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* **425**, 323–328.
- Hagen, S., Marx, F., Ram, A. F. and Meyer, V. (2007) The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2128–2134.
- Borgia, P. T., Iartchouk, N., Riggle, P. J., Winter, K. R., Koltin, Y. and Bulawa, C. E. (1996) The *chsB* gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal hyphal growth and development. *Fungal Genet. Biol.* **20**, 193–203.
- Yanai, K., Kojima, N., Takaya, N., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M. (1994) Isolation and characterization of two chitin synthase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 1828–1835.
- Pozos, T. C., Sekler, I. and Cyert, M. S. (1996) The product of HUM1, a novel yeast gene, is required for vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchange and is related to mammalian $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3730–3741.
- Cunningham, K. W. and Fink, G. R. (1996) Calcineurin inhibits VCX1-dependent $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange and induces Ca^{2+} ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 2226–2237.
- Araújo-Bazán, L., Penalva, M. A. and Espeso, E. A. (2008) Preferential localization of the endocytic internalization machinery to hyphal tips underlies polarization of the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **67**, 891–905.
- Polizotto, R. S. and Cyert, M. S. (2001) Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J. Cell Biol.* **154**, 951–960.

- 40 Clement, D. J., Stanley, M. S., Attwell, N. A., Clipson, N. J., Fincham, D. A. and Hooley, P. (1996) Evidence for *sltA1* as a salt-sensitive allele of the arginase gene (*agaA*) in the ascomycete *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* **29**, 462–467
- 41 Han, K. H. and Prade, R. A. (2002) Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* **43**, 1065–1078
- 42 Platara, M., Ruiz, A., Serrano, R., Palomino, A., Moreno, F. and Arino, J. (2006) The transcriptional response of the yeast Na⁺-ATPase ENA1 gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **281**, 36632–36642
- 43 Ruiz, A. and Arino, J. (2007) Function and regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA sodium ATPase system. *Eukaryotic Cell* **6**, 2175–2183
- 44 Saloheimo, A., Aro, N., Ilmen, M. and Penttilä, M. (2000) Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys₂-His₂ transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J. Biol. Chem.* **275**, 5817–5825
- 45 Munro, C. A., Selvaggini, S., de Bruijn, I., Walker, L., Lenardon, M. D., Gerssen, B., Milne, S., Brown, A. J. and Gow, N. A. (2007) The PKC, HOG and Ca²⁺ signalling pathways co-ordinately regulate chitin synthesis in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* **63**, 1399–1413
- 46 Penalva, M. A. and Arst, Jr, H. N. (2002) Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 426–446
- 47 Lamb, T. M. and Mitchell, A. P. (2003) The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 677–686
- 48 Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882
- 49 Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* **5**, 150–163

Received 15 February 2008/6 May 2008; accepted 12 May 2008

Published as BJ Immediate Publication 12 May 2008, doi:10.1042/BJ20080344

SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

Two zinc finger transcription factors, CrzA and SltA, are involved in cation homoeostasis and detoxification in *Aspergillus nidulans*

Anja SPIELVOGEL^{*†}, Helen FINDON[‡], Herbert N. ARST, JR[‡], Lidia ARAÚJO-BAZÁN[†], Patricia HERNÁNDEZ-ORTÍZ[†], Ulf STAHL^{*}, Vera MEYER^{*} and Eduardo A. ESPESO^{†1}

^{*}Department of Microbiology and Genetics, Institute of Biotechnology, Berlin University of Technology, Gustav-Meyer-Allee 25, D-13355 Berlin, Germany, [†]CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Centro Investigaciones Biológicas, Department of Molecular Microbiology, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain, and [‡]Department of Microbiology, Imperial College London, Flowers Building, Armstrong Road, London SW7 2AZ, U.K.

Table S1 Plasmids used in the present study

Plasmid	Characteristics	Source
pGEX-CrzA123(469-603)	pGEX-2T derivative driving expression of GST–CrzA (amino acids 469–603)	The present study
pGEX-SltA (381-549)	pGEX-2T derivative driving expression of GST–SltA (amino acids 381–549)	The present study
pBSKdeltaCrzA	pBluescriptSK(+) derivative containing <i>crzA</i> deletion cassette	The present study
pBSdeltaSltA	pBluescriptSK(+) derivative containing <i>sltA</i> deletion cassette	The present study
P1548	pBluescriptSK(+) derivative containing <i>A fumigatus riboB</i> gene	Dr Berl Oakley (Department of Molecular Genetics, Ohio State University, Columbus, OH, U.S.A.)
pGEM-T-CrzAcDNA	pGEM-T-Easy derivative containing cDNA of CrzA	The present study

¹ To whom correspondence should be addressed (e-mail eespeso@cib.csic.es).

Table S2 Primers used in the present study

The underlined sequences indicate restriction sites used for cloning purposes.

Primer	Sequence (5' → 3')	Target
An0471 fw	GGAGTCTAGCGAACAAGATG	<i>A. nidulans</i> ORF AN0471/VcxA
An0471 rev	CTGTCAATGCTGCCGACTAA	<i>A. nidulans</i> ORF AN0471/VcxA
An6642 fw	TCAACGTCGGAACACCTCTT	<i>A. nidulans</i> ORF AN6642/EnaA
An6642 rev	TTGACACCGTCACCACTCAT	<i>A. nidulans</i> ORF AN6642/EnaA
An1628 fw	TCGTGCTGCAGGTGCTGAT	<i>A. nidulans</i> ORF AN1628/EnaB
An1628 rev	TATTGGTCACCGCTCCAAGG	<i>A. nidulans</i> ORF AN1628/EnaB
An10982 fw	AGGACATCCTCTCGCTACAG	<i>A. nidulans</i> ORF AN10982/EnaC
An10982 rev	TCCTTCTCCAGCCAGTCTCT	<i>A. nidulans</i> ORF AN10982/EnaC
An2523 fw	ATGTAGTCGTCGATGCTCTG	<i>A. nidulans</i> ORF AN2523/ChsB
An2523 rev	AAGAGCGACAACCGCATTAG	<i>A. nidulans</i> ORF AN2523/ChsB
Anid AcnA	CGGAATTCGATCGGTATGGTCAGAAGG	<i>A. nidulans</i> actin gene/exon 5
Anid AcnB	CGGAATTCGATGTTGCCGTACAGATCC	<i>A. nidulans</i> actin gene/ exon 5
CrzA-8 fw	<u>GGAAATTC</u> CGCAGCGCGTCT	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> gene
CrzA-9 rev	<u>GGAAATTC</u> CGCAACGCCGAACC	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> gene
CrzA-ZF-fw-BamHI	<u>CGGAATTC</u> TATATTCTTGGCTGGCTGACCC	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> gene
CrzA-ZF-rev-EcoRI	<u>GGAAATTC</u> CGTGCGTTCTCGCTCTTGAGAC	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> gene
SltA-ZF-fw-BamHI	<u>CGGAATTC</u> CCCTTCGATGAAGCGATCTCTCAG	<i>A. nidulans</i> <i>sltA</i> gene
SltA-ZF-rev-EcoRI	<u>GAAATTC</u> GAGTCAGGCGCTTCGGAAGGAG	<i>A. nidulans</i> <i>sltA</i> gene
Sltnul1	<u>AAGCGGCCG</u> CGAACATCTCTGCG	<i>A. nidulans</i> <i>sltA</i> 5' untranslated region
Sltnul2	<u>CGCGATCCG</u> ACGGTCCCTAATGTC	<i>A. nidulans</i> <i>sltA</i> 5' untranslated region
Sltnul3	<u>CGGAATTC</u> TCGTCACATTGGTGG	<i>A. nidulans</i> <i>sltA</i> 3' untranslated region
Sltnul4	<u>ACCTCGAGT</u> CAGCATCCGTAGC	<i>A. nidulans</i> <i>sltA</i> 3' untranslated region
CrzA KO fw	TCGCGTGGTATCTATTCTGG	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> gene
CrzA KO rev	AGCACTCCAACCTCCTACCT	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> gene
Crznulo-1	<u>AAGCGGCCG</u> CAACGCAGTTAAGTGC	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> 5' untranslated region
Crznulo-2	<u>CCTGCAGCG</u> TATCTTGAGG	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> 5' untranslated region
Crznulo-3	TGCATCCCTTTGCTACC	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> 3' untranslated region
Crznulo-4	CTACGCATTGCTGTGG	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> 3' untranslated region
CrzA1	GACTCCTCCAACAGAAGGCTATCCGAATGG	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> 3' end of the ORF
CrzA2	TTTCCCCCAGTTCGGATTGCGTAGCCAGC	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> 3' end of the ORF
CrzA3	CTTTGCTACCTATTTCTCTGTTCAAGTAGGG	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> 3' untranslated region
CrzA4	CAACCCGACCCCTACACTTCTCTACATCG	<i>A. nidulans</i> <i>crzA</i> 3' untranslated region
CrzA-GFP1	GCTGGCTACGCAATCCGAACCTGGGGAAAGGAGCTGGTGAGGCCGCTGGAGCC	Amplification of <i>gfp/pyrGAfum</i> cassette
CrzA-GFP2	GGGTACTGAACAGAGAAATAGGTAGCAAAGCTGTCTGAGAGGAGGCAGTGATG	Amplification of <i>gfp/pyrGAfum</i> cassette
Pyr4 fw	GACCTGATCACAGGGTGGGAC	<i>N. crassa</i> <i>pyr4</i> gene
Pyr4 rev	GTGGATGAAGTTGTCTGCTTG	<i>N. crassa</i> <i>pyr4</i> gene
CDRE-5	CGCTAGGAGCAAGAGGCTCTGCTGACAGACA	<i>A. giganteus</i> <i>afp</i> promoter
CDRE-5(—)	CGTGTCTGTGACGAGGCCTCTTGCTCCTAG	<i>A. giganteus</i> <i>afp</i> promoter
SltA-1	GCTGGCTCACATCAGGCATGAATCATGGTTCAT	<i>A. giganteus</i> <i>afp</i> promoter
SltA-1(—)	GCATGAACCATGATTATGCCTGATGTGAGCCA	<i>A. giganteus</i> <i>afp</i> promoter
Ace1-2C-1	CGTACATAAGTTAATGCCTAAAGAAGTCATATACCA	<i>T. reesei</i> <i>cbh1</i> promoter
Ace1-2C-2	CGTGGTATATGACTTCTTTAGGCATTAACTTATGTA	<i>T. reesei</i> <i>cbh1</i> promoter
Ace1-2C4-1	CGTACATAAGTTATGCAGCAAGAAGTCATATACCA	<i>T. reesei</i> <i>cbh1</i> promoter
Ace1-2C4-2	CGTGGTATATGACTTCTTTGCTGCATAACTTATGTA	<i>T. reesei</i> <i>cbh1</i> promoter
Chs-CDRE-1fw	CGCTAAAGATACTGGAGCCACTTCTCTAGT	<i>A. nidulans</i> <i>chsB</i> promoter
Chs-CDRE-1rev	CGACTAGAGAAGTGGCTCCAGTATCTTTAG	<i>A. nidulans</i> <i>chsB</i> promoter

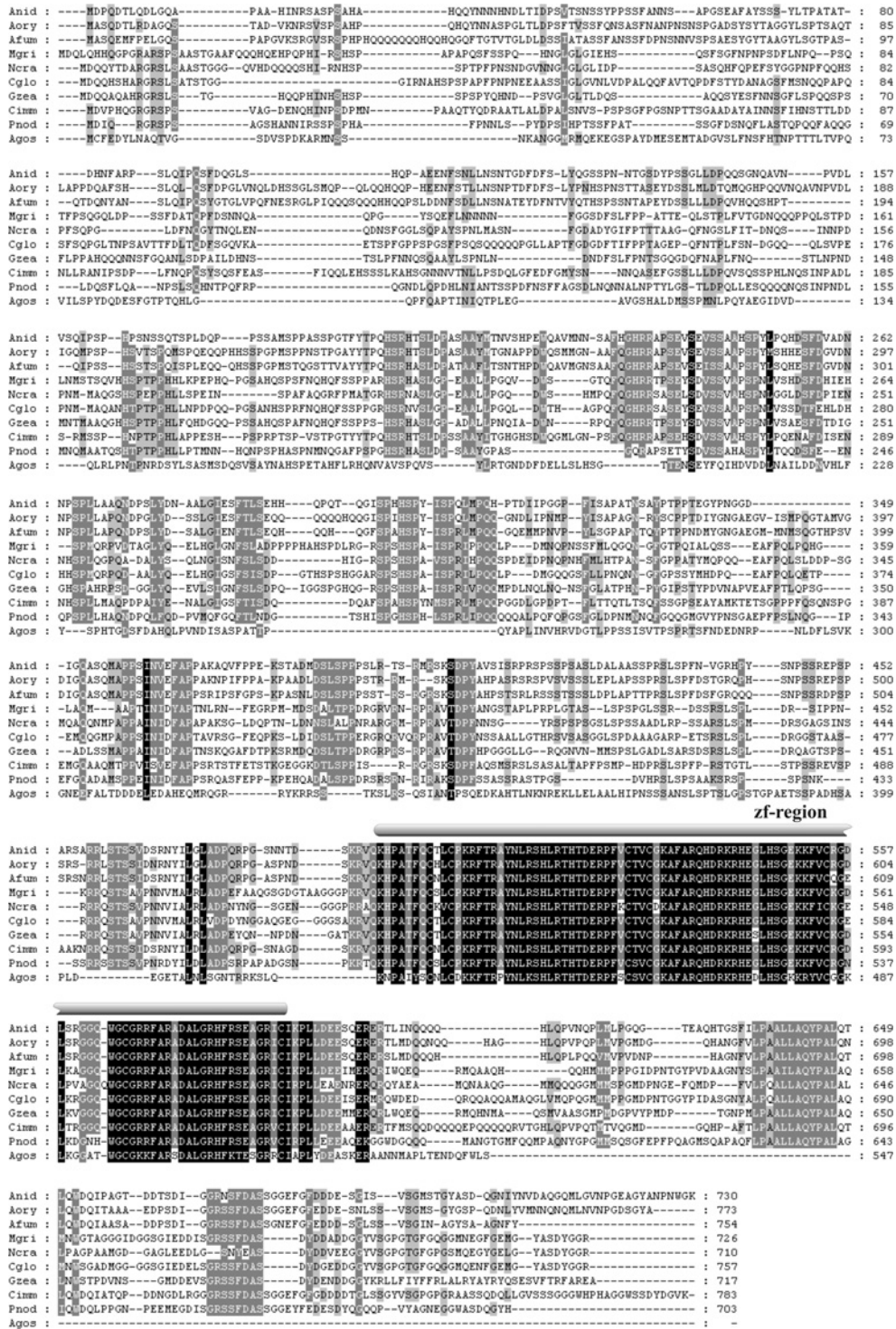


Figure S1 Multiple alignment of filamentous fungal putative CrzA orthologues

Alignment was generated using ClustalX software. Similarities conform to the Blosom64 score table. The zinc-finger region (zf-region) is indicated by a grey bar above the alignment. Black shading indicates full conservation. Several blocks of conserved residues can be noted in the alignment; however, these conserved blocks are not present in the *Ashbya gossypii* (Agos) amino acid sequence, although it is a filamentous fungus. Residue shading follows BLOSUM32 similarities. Organism codes and GenBank® Entrez Protein accession numbers are: Anid, *Aspergillus nidulans* BAE94327; Aory, *Aspergillus oryzae* BAE57003; Afum, *Aspergillus fumigatus* EAL88401; Mgr, *Magnaporthe grisea* XP_359644; Ncra, *Neurospora crassa* EAA32849; Cglo, *Chaetomium globosum* EAQ88414; Gzea, *Gibberella zeae* XP_381517; Cimm, *Coccidioides immitis* EAS33001; Pnod, *Phaeosphaeria nodorum* EAT87393; Agos, *A. gossypii* AAS51722.



(A) Multiple alignment of the zinc-finger domains or predicted SItA homologues. Amino acids putatively involved in chelating Zn^{2+} are indicated (stars). The bar under the alignment, labelled as zf-ACR (zinc-finger-adjacent conserved region), indicates the region containing the *sItA1* mutation. The tryptophan residue removed (along with residues C-terminal to it) by *sItA1* mutation is indicated by an arrowhead (*sItA1*-W-stop). Residue shading follows BLOSUM32 similarities. GenBank® Entrez Protein accession numbers: *Aspergillus nidulans*, XP_660523; *Neosartorya fischeri*, XP_001263639; *Aspergillus niger*, XP_001397517; *Aspergillus fumigatus*, XP_754813; *Coccidioides immitis*, XP_001248579; *Chaetomium globosum*, XP_001219997; *Magnaporthe grisea*, XP_361983; *Botryotinia fuckeliana*, XP_001549518; *Neurospora crassa*, XP_963927; *Aspergillus terreus*, XP_001209054; *Ajellomyces capsulatus*, XP_001543193; *Aspergillus clavatus*, XP_001270817; *Hypocrea jecorina*, AAF35286. **(B)** A schematic diagram of the gene-replacement strategy used to generate the *sItA* deletion using the *riboB* gene of *A. fumigatus* (*riboB^Δlum*) as a selectable marker.